

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

SUR LA VACCINATION PRÉVENTIVE DE LA TUBERCULOSE PAR INJECTION SOUS-CUTANÉE DE BCG CHEZ LES ÉLÈVES-INFIRMIÈRES DE L'HOPITAL ULLEVAL, A OSLO (NORVÈGE)

par J. HEIMBECK (Oslo).

On sait par nos publications antérieures (1) que, dès 1926, à l'hôpital Ulleval, d'Oslo, nous avons entrepris de vacciner par injection sous-cutanée de vaccin BCG celles de nos élèves-infirmières qui ne réagissaient pas à l'épreuve tuberculinique de Pirquet (cuti-tuberculation).

Les raisons qui nous ont portés à prendre cette décision étaient les suivantes :

1° Les élèves infirmières qui, lors de leur admission à l'école, présentent une cuti-réaction négative sont fréquemment infectées et présentent des manifestations tuberculeuses peu de temps après qu'elles ont commencé leur service dans les salles de malades tuberculeux;

2° Par contre, celles qui réagissent positivement à la tuberculine lors de leur admission et qui, par conséquent, sont déjà

(1) *Presse Médicale*, 31 août 1927; *Ces Annales*, 42, février et août 1928.

porteuses de lésions tuberculeuses bénignes, ne sont que très rarement atteintes de formes graves de tuberculose, ce qui indique qu'elles possèdent déjà un certain degré d'immunité;

3° Il est établi qu'une injection sous-cutanée de BCG suffit à provoquer, après un assez court délai (un à deux mois), la sensibilité à la tuberculine, donc à créer l'état d'allergie.

Depuis 1927, comme l'indique le tableau ci-après, les vaccinations ont été effectuées systématiquement, en nombre toujours croissant, leur efficacité protectrice apparaissant de plus en plus évidente.

En 1927, sur 56 élèves-infirmières à cuti-réaction négative, 44 ont demandé à être vaccinées, 12 s'y sont refusées. En 1928, sur 58 élèves, 40 ont sollicité la vaccination, 18 l'ont refusée.

En 1929, sur 56, 52 ont été vaccinées, 4 ont refusé (1).

Depuis 1924 nous avons pratiqué et noté avec soin les réactions tuberculiniques de chaque élève, et comme aucune d'entre elles n'échappe à notre observation, on peut se rendre compte très exactement des effets de la vaccination sur celles qui l'ont acceptée et connaître tous les incidents pathologiques qu'elles présentent en les comparant au groupe des élèves non vaccinées réagissant à la tuberculine d'une part, et d'autre part, au groupe des non-vaccinées et non réagissantes.

On voit, par les chiffres consignés dans ce tableau, que les sujets vaccinés ne présentent que très exceptionnellement des manifestations tuberculeuses : une seule des 44 élèves vaccinées en 1927, ayant bientôt terminé leurs trois années de stage d'école, a fait une pleurésie, soit 2,2 p. 100, alors que 28 p. 100 des infirmières à réaction négative de la même période de scolarité et non-vaccinées, ont contracté différentes formes de tuberculose.

L'efficacité de la vaccination se montre encore plus évidente si l'on compare la morbidité tuberculeuse parmi les vaccinées à celle des non-vaccinées au cours des trois années consécutives, en ne tenant compte que des infirmières occupées aux

(1) Les doses de BCG injectées par nous ont été : en 1927, 0 milligr. 05 ; en 1928, alternativement 0 milligr. 05 et 0 milligr. 025. Nous n'avons observé aucune différence dans les effets de ces doses, sauf que la plus forte provoque plus souvent un abcès au lieu d'injection. Depuis 1929, nous employons uniformément la dose de 0 milligr. 025.

VACCINATION PRÉVENTIVE DE LA TUBERCULOSE PAR LE BCG 1231

TABLEAU.

ANNÉES	CUTITUBERCULINATION	NOMBRE d'élèves infirmières	MORBIDITÉ TUBERCULEUSE				TOTAL des cas de tuberculose	POURCENTAGE
			1 ^{re} année	2 ^e année	3 ^e année	Au delà de la 3 ^e année		
1924	Positive	58	0	0	0	1	4	4,7
	Négative	51	9	5	2	1	17	33,3
1925	Positive	42	0	1	0	0	4	2,4
	Négative	72	12	8	1	0	21	29,1
1926	Positive	52	1	0	0	0	1	1,9
	Négative	62	12	3	0	0	15	24,0
1927	Positive	64	1	1	0 (*)		2	3,1
	Négative, vaccinées au BCG	44	0	0	1		1	2,3
	Négative	42	4	1	0		5	41,6
1928	Positive	66	1	1 (*)			2	3,0
	Négative, vaccinées au BCG	40	1	1			2	5,0
	Négative	18	9	0			9	50,0
1929	Positive	61	1 (*)				1	1,6
	Négative, vaccinées au BCG	52	0				0	0
	Négative	4	0				0	0

(*) Jusqu'à présent.

mêmes services, donc exposées aux mêmes conditions d'infection.

Or, sur 34 non-vaccinées, 14, soit 41,2 p. 100 ont contracté des formes plus ou moins graves de tuberculose :

3 Érythème noueux.

7 Érythème noueux et infiltration pulmonaire.

1 Infiltration pulmonaire.

3 Infiltration pulmonaire avec pleurésie.

Tandis que, sur 136 vaccinées, 3 seulement, soit 2,2 p. 100 ont présenté de légers signes de pleurésie, sans gravité.

La vaccination n'a provoqué aucun incident, ni même aucune gêne et aucun trouble de la santé.

Ces expériences, faites dans des conditions vraiment idéales, sous un contrôle permanent, prouvent que la vaccination BCG confère manifestement l'immunité contre la tuberculose et que, dans un milieu particulièrement exposé aux risques d'infection, elle réduit la morbidité tuberculeuse à un taux bien moindre que le plus bas qui ait jamais été observé.

Nos autres essais de vaccination par voie sous-cutanée, réalisés sur une bien plus vaste échelle sur les paysans du district rural de Sollien et sur les habitants de la ville d'Oslo, ne nous ont également apporté aucune déception. Mais comme les conditions d'existence, les modes d'infection, etc. ne peuvent pas encore être appréciés exactement pour cette catégorie spéciale de vaccinés, nous préférons attendre avant d'en publier les résultats. Nous pouvons cependant dire qu'à Sollien, depuis deux ans que la vaccination y est introduite, il ne s'est produit aucun nouveau cas de tuberculose, bien que les sources d'infection y soient abondantes pour les vaccinés, alors que, pendant les deux années antérieures à la vaccination, il s'était produit 5 nouveaux cas de tuberculose.

Les résultats que nous avons obtenus jusqu'ici de l'emploi systématique du BCG sont donc extrêmement satisfaisants et encourageants.

ÉTUDE DES VARIATIONS LEUCOCYTAIRES CHEZ LES ENFANTS VACCINÉS PAR LE BCG

par GUSTAVO PITTALUGA,

Professeur à l'Université de Madrid,

et FERNANDO GARCIA,

Médecin assistant au Laboratoire.

*(Faculté de Médecine de Madrid,
Laboratoire central de recherches cliniques,
Directeur : professeur G. PITTALUGA.)*

Le virus-vaccin Calmette-Guérin détermine dans l'organisme de l'enfant nouveau-né, c'est-à-dire dans l'organisme non tuberculisé, une série de modifications humorales qui conduisent à un véritable état d'allergie. Parmi les travaux de ces dernières années, ceux qui ont été apportés à la Conférence internationale convoquée à Paris par la Section d'Hygiène de la Société des Nations, en octobre 1928 [1] démontrent que ce bacille Calmette-Guérin agit comme un antigène tuberculeux, sauf pour ce qui concerne le type évolutif des lésions anatomo-pathologiques. L'inoculation parentérale du vaccin BCG provoque, après un certain temps — variable suivant les doses et les procédés d'introduction — la sensibilité à la tuberculine (Pirquet, Mantoux). Par contre, il semble que l'administration par voie buccale du BCG ne provoque cette sensibilité qu'avec une certaine irrégularité. Dans une proportion de cas extrêmement élevée, après cette période de sensibilisation de l'organisme que l'on peut considérer comme une réaction d'immunité, la « prémunition » contre l'infection tuberculeuse est établie.

Parmi les preuves rassemblées par Calmette et ses collaborateurs (Guérin, Boquet et Nègre, Turpin, Weill-Hallé et autres) ou publiées par des observateurs de différents pays, pour préciser la nature du processus d'immunisation spécifique déterminé par le BCG dans l'organisme des animaux d'expériences et

surtout chez les enfants nouveau-nés, il apparaît que personne n'ait étudié jusqu'à présent, d'une façon méthodique, les *réactions hématologiques*, en particulier les variations dans la morphologie des éléments cellulaires du sang.

Or, il importerait de savoir jusqu'à quel point et dans quelle mesure les variations leucocytaires provoquées par le vaccin BCG correspondent, pendant la période de sensibilité active de l'organisme vacciné, aux altérations caractéristiques déterminées par le bacille de Koch.

Dans le Mémoire publié par la Section d'Hygiène de la Société des Nations à l'occasion de la Conférence du mois d'octobre 1928 à Paris [2], Y. Biraud a compulsé, dans son « Étude critique de la Bibliographie du BCG et de la vaccination antituberculeuse par la méthode de Calmette », 313 travaux parus jusqu'au mois d'août 1928. Aucun de ces travaux ne fait mention de recherches hématologiques. Depuis cette date, nous avons trouvé seulement dans un travail très récent de Daniel Boer (*Thèse* de l'Université de Leyde, Hollande, juillet 1929), qui nous avait été signalé par L. Sayé, des données d'observations hématologiques pratiquées dans 9 cas [3]. Ni le rapport de Wallgren [4], qui comprend l'histoire clinique de 61 enfants de l'hôpital de Gothenbourg (Suède), jusqu'au 30 avril 1929, ni la *Thèse* de Hyéronimus avec ses 53 observations de vaccinés du service du Dr Lemaire [5] à l'hôpital Ambroise-Paré, de Paris, ni l'étude de Jakhnis (de Kharkoff) sur les documents de la Commission de l'Ukraine (818 enfants vaccinés jusqu'à la fin de 1928) [6], n'envisagent l'examen du sang des enfants soumis à la prémunition par le BCG. En Espagne, Sayé [7] et ses collaborateurs, qui avaient vacciné (par voie buccale) 442 enfants jusqu'au mois de septembre 1928, n'avaient été en mesure d'ajouter aux données relatives à la *mortalité*, à la *morbidité*, au *développement*, aux *réactions à la tuberculine* et aux *explorations radiographiques*, aucun résultat de recherches hématologiques. Même état de choses dans les cas de Munoyerro, Bravo Frias et autres [8]. Le mémoire de Boer, dont nous avons parlé [3], publié en juillet 1929, c'est-à-dire trois ou quatre mois après que nos recherches avaient été entreprises, rapporte les examens du sang de 9 cas, tous vaccinés par *voie sous-cutanée* après réaction négative à la tuberculine (Pirquet). Dans un certain nombre

de ces cas, on avait constaté la formation de petits abcès froids consécutifs à l'injection du BCG. Or, il apparaît : 1° Que l'âge de ces enfants de Boer était beaucoup plus avancé que celui des nôtres (nous avons toujours vacciné, comme on le verra, des nouveau-nés de cinq à quinze jours, tandis que Boer a vacciné des enfants de trois à dix mois);

2° Que le procédé de vaccination (voie buccale dans notre cas, voie cutanée dans les cas de Boer) était différent;

3° Que l'épreuve tuberculinique et la formation d'abcès constituent des facteurs qui ont une influence sur les éléments cellulaires du sang dans un sens qui rend peu comparables les résultats de Boer avec les nôtres. Nous y reviendrons néanmoins à la fin de cette étude.

*
*
*

Ce travail a été commencé en avril 1929. Nous nous sommes proposé d'établir les *variations leucocytaires qui se produisent, d'une part après que la vaccination par le BCG a été effectuée par voie digestive chez les enfants nouveau-nés; d'autre part chez des enfants témoins, non vaccinés, provenant des mêmes milieux.*

Si le vaccin BCG réalise une forme prémunisante d'infection à réactions locales et générales spécifiques, il doit se produire pendant le processus de sensibilisation et d'immunisation de l'organisme — toujours accompagné ou précédé par une prolifération discrète, parasitaire, du virus-vaccin — un type de réaction cellulaire (dont nous trouverons l'expression dans une modification de l'équilibre leucocytaire du sang) correspondant, peut-être à un moindre degré, au type de réaction qui accompagne le processus de l'infection tuberculeuse primitive [9]. Les manifestations leucocytaires de ce processus dépendent en grande partie de la mobilisation des réticulocytes (cellules du système réticulo-endothélial, macrophages ou monocytes du sang); en partie aussi de la réaction lymphatique (lymphocytose) [10], et enfin de la néoformation histiogène de granulocytes éosinophiles (éosinophilie locale et hématiche). Ce sont les phases, concomitantes ou successives (selon la forme et l'évolution du processus tuberculeux), d'un

seul phénomène histopathologique extrêmement compliqué qui comprend, même quand nous le saisissons dans ses manifestations primaires les plus pures, des activités défensives multiples, surtout de la part du système réticulo-endothélial et du tissu lymphoïde [41].

Un travail très récent de Ciuca, Francke et Vitner-Rosenthal [42] démontre, par l'étude histo-pathologique des organes de 5 enfants vaccinés au BCG par la voie buccale, morts à la suite de maladies intercurrentes, entre deux et douze mois après la vaccination, que les lésions folliculaires spécifiques dépendant de la localisation du BCG, surtout dans les ganglions mésentériques et dans le foie — lésions trouvées dans leurs phases d'involution et de cicatrisation fibreuse — sont caractérisées également par une prolifération intense des éléments cellulaires du système réticulo-endothélial (réticulocytes en général, macrophages et fibroblastes) et par une infiltration moins constante de granulocytes. Ces observations confirment la correspondance entre le type des lésions histologiques déterminées par le BCG et celui d'une phase raccourcie, à évolution rapidement favorable, des lésions produites par le bacille de Koch. Elles viennent à l'appui des résultats du long travail expérimental de Calmette et de ses collaborateurs sur l'histologie pathologique des altérations cellulaires produites par le BCG chez les animaux [43].

Dans une étude toute récente, provenant de l'école de Madsen (Copenhague) sur la virulence du bacille Calmette-Guérin [44], Jensen, Mørch et Orskov arrivent aux mêmes conclusions. A l'autopsie de cobayes vaccinés par voie buccale du deuxième au cinquième jour après la naissance, et sacrifiés à différentes époques, on observe des nodules de cellules épithélioïdes et des groupements de fibroblastes dans le foie et le poumon soixante jours après la vaccination (prolifération de cellules réticulaires dans les ganglions lymphatiques, etc.), en coïncidence avec la période pendant laquelle commencent à se manifester (chez 17 p. 100 des animaux vaccinés) les réactions positives à la tuberculine. Ces réactions arrivent à un maximum de 73 p. 100 du sixième au septième mois, lorsque les autopsies démontrent la transformation fibreuse définitive des lésions. Il faut ajouter que l'existence de ces lésions spécifiques (preuve indubitable

du processus histo-pathologique défensif), n'est pas toujours accompagnée par la réaction de sensibilisation à la tuberculine.

Tout cela nous conduit à penser que, *déjà pendant les premiers mois, voire les premières semaines qui suivent la vaccination par le BCG, même par voie digestive, chez les enfants nouveau-nés, des signes de réactions histo-pathologiques qui accompagnent le processus prémunisant doivent pouvoir être observés dans la morphologie du sang.*

*
* *

Les résultats que nous allons exposer proviennent :

1° De l'étude d'un groupe de 100 enfants nouveau-nés vaccinés au BCG à la Maison des Enfants Trouvés « Inclusa » de Madrid;

2° D'un groupe de 10 enfants *non-vaccinés* (témoins) du même établissement;

3° d'un groupe de 10 enfants choisis parmi 47 vaccinés de l'Ecole de puériculture de Madrid.

Nous remercions vivement les D^s Muñoyerro et Bravo Frias, ainsi que leurs assistants, médecins internes de la « Inclusa », MM. Pedraza, Sanchez de Leon, Jaso et Aguado. Nous exprimons aussi nos sentiments de gratitude au professeur Suñer, directeur de l'Ecole de puériculture, et aux médecins de section de cette école, MM. Sanchez Linares et Muñoz Seca. Nous leur devons tout le matériel clinique qui fait l'objet de ce travail.

Nous nous sommes proposé d'établir, pendant trois mois consécutifs au moins, les formules leucocytaires de ces enfants, par des examens répétés à des intervalles de quelques jours au début, puis de quinze en quinze jours. La première prise de sang a toujours été faite soit la veille, soit le jour même du commencement de la vaccination, avant l'administration de la première dose de BCG. La deuxième a été faite deux jours après. Les dates des examens ultérieurs sont indiquées dans les tableaux que le lecteur trouvera plus loin.

Les frottis de sang ont été fixés à l'alcool méthylique absolu, aussitôt après la prise. Les préparations ont été colorées au Giemsa ou au May-Grünwald-Giemsa. Dans quelques cas, nous avons employé les méthodes de coloration vitale au rouge neutre et au vert Janus ainsi qu'au Soudan III, pour l'étude des monocytes.

Nous avons fait en sorte de recueillir les préparations de sang, pour tous les enfants, aux mêmes heures en rapport avec l'alimentation, et aux mêmes périodes de temps après l'ingestion de la première dose de vaccin. Nous devons reconnaître que nous n'avons pas toujours réussi dans cet effort. Mais nous croyons, — et le lecteur pourra s'en rendre compte — que les écarts sont assez faibles pour assurer une comparaison exacte des différents cas.

La vaccination a été pratiquée en suivant exactement les indications de Calmette (dilution d'une dose de BCG dans une petite cuillère de lait de la mère ou de la nourrice). Les trois doses étaient administrées en six jours. Le vaccin BCG employé à la « Inclusa » provenait des cultures de l'Institut National d'Hygiène Alfonso XIII (issues de l'Institut Pasteur de Paris); le vaccin employé à l'Ecole de Puériculture était préparé par l'Institut de Biologie et de Sérothérapie « Iby » (Madrid) (provenant également du Service de M. Calmette).

D'accord avec les chefs de service de la « Inclusa », MM. Muñoyerro et Bravo Frias, nous avons toujours éliminé les enfants nés avant terme et les atrepsiques.

Nous ne connaissons les antécédents familiaux d'aucun des nouveau-nés de l'« Inclusa ». Pour le petit groupe d'enfants de l'Ecole de Puériculture suivis dans leur milieu domestique, les données recueillies sont indiquées dans nos protocoles.

Une partie seulement des 100 enfants observés à la Maison des Enfants-Trouvés « Inclusa » ayant été vaccinés dès le mois de mai nous a permis de réunir un nombre suffisant d'analyses pour en tirer des conclusions. Les autres sont encore à l'étude. Plusieurs sont morts de maladies infectieuses intercurrentes (1). Quelques autres ont été réclamés par leurs mères à un moment plus ou moins éloigné de la vaccination et du début de l'étude hématologique.

Cela nous oblige à grouper nos observations de la manière suivante :

A. Groupe de 12 enfants avec 7 ou un plus grand nombre d'examens du sang.

(1) Ces cas feront l'objet d'une publication particulière des Dr^s Muñoyerro et Bravo Frias.

B. Groupe de 49 enfants avec 6 examens.

C. Groupe de 28 enfants avec 5 examens.

D. Groupe de 29 enfants avec 4 examens.

E. Groupe de 13 enfants avec 3 examens.

F. Groupe de 10 enfants avec 4 examens. (de l'Ecole de Puériculture).

G. Groupe de 10 enfants témoins (*non vaccinés*). (Ce dernier groupe a été porté à 22 pendant les mois d'août et septembre, mais nous ne pouvons pas en utiliser ici les chiffres, car nous n'en disposons qu'au moment de corriger cette épreuve.)

Le lecteur trouvera, pour chacun des groupes, le détail de nos observations sous forme de tableaux annexés au présent mémoire.

*
* *

Si nous entreprenons l'étude détaillée des numérations que nous avons effectuées, nous arrivons à des constatations intéressantes. Avant tout on est impressionné par *la précocité indéniable des modifications de la formule leucocytaire, modifications qui commencent à être appréciables dans la majorité des cas après l'administration des premières doses du vaccin, et qui s'établissent d'une façon évidente à partir de la deuxième semaine après la vaccination*. On peut même observer un certain cycle d'évolution de ces réactions. En général, un maximum s'établit entre la troisième et la cinquième semaine à partir de la date de la vaccination; ensuite — comme on peut l'observer dans les cas du groupe A qui ont été suivis avec 7 ou 8 analyses pendant deux mois (ou plus), — la formule leucocytaire tend à reprendre son type primitif. Nous faisons cependant cette réserve qu'un nombre plus grand d'analyses du sang pour chaque cas est nécessaire pour affirmer l'exactitude de cette dernière conclusion.

En second lieu, on peut facilement se rendre compte de ce fait que, lorsque la morphologie du sang correspond, dans tel cas concret, au type général qui est propre au nouveau-né, les modifications qui suivent la vaccination se font presque toujours dans le sens que nous indiquons et que nous considérons comme une réaction caractéristique; tandis que, dans les cas où le nouveau-né, pour des causes constitutionnelles ou autres,

présente *a priori*, à l'analyse pratiquée avant la vaccination, une image leucocytaire divergente, nous observons en général une inversion des modifications qui se produisent à la suite de la vaccination.

La modification la plus fréquente et la plus nette consiste en l'augmentation des monocytes. Nous comprenons sous cette désignation des cellules qui ont quelquefois les caractères des éléments endothéliaux; mais ces cas sont très rares. C'est en raison de cette rareté que nous n'avons pas cru nécessaire de les séparer des grands mononucléaires macrophages (vrais monocytes). Cette *monocytose* est frappante par son degré et par sa persistance dans plusieurs cas (voir : A) 2, 3, 5, 6, 8, 10, 11 : B) 13, 20, 21, 23, 25, 26, 27, 30, etc). *Elle est presque constante*, même si elle n'est pas très intense, quand le point de départ (avant la vaccination) dans le sang du nouveau-né est dans des limites que nous appellerons normales, entre 4 et 6 monocytes pour 100 leucocytes (voir les chiffres moyens des 20 observations témoins, qui donnent, pendant la première semaine de vie 6,2 à 6,3 p. 100 de monocytes). Dans certains cas on atteint des chiffres de 20, 24, même 30 (maximum 31 p. 100). La moyenne, à la troisième ou quatrième semaine après la vaccination, dépasse 15 p. 100. C'est une monocytose accentuée et franchement anormale, dont nous verrons la signification tout à l'heure.

Mais il y a un groupe d'enfants nouveau-nés qui présentent dès leurs premiers jours, avant le commencement de la vaccination, une monocytose. Quelquefois cette monocytose atteint des taux très élevés (16, 18, même 22 monocytes p. 100 leucocytes, entre le cinquième et le dixième jour après la naissance); [voir les détails de ces cas dans les groupes A, B, C, D].

Nous ne sommes pas en mesure, actuellement, de formuler des hypothèses sur cet état pathologique du sang du nouveau-né. Nous y reviendrons ultérieurement. Mais nous voulons signaler ici ce fait curieux, à savoir que, dans la majorité de ces cas, nous assistons, après la vaccination au BCG, à une diminution passagère des monocytes, qui quelquefois remontent, après la chute initiale, à des taux à peu près comparables à ceux du point de départ. Nous sommes autorisés dans ces cas à parler d'une *inversion de la réaction monocyttaire normale après vaccination*.

Cette réaction monocyttaire n'en reste pas moins acquise comme un fait indubitable puisque nous avons vu que *les taux moyens de tous les groupes d'enfants examinés* (qui s'élèvent à 110) *sont entre 15 et 16 monocytes pour 100 leucocytes* aux deuxième et quatrième semaines après la vaccination, alors que la moyenne des analyses antérieures à la vaccination ou dans le groupe témoin (G) reste entre 6 et 9 p. 100.

Une deuxième modification s'établit, en général un peu plus tard ou plus lentement, c'est *l'augmentation des lymphocytes aux frais des granulocytes neutrophiles*. C'est une grande erreur, comme nous le verrons, de considérer une lymphocytose élevée comme normale dans la toute première enfance. L'état lymphoïde de l'enfant ne s'établit en réalité que plus tard. Nous voyons, en examinant nos taux leucocytaires, que, pour la généralité des enfants vaccinés, cette lymphocytose survient après deux, trois, quatre semaines, quelquefois plus tard. Le nombre des granulocytes (polynucléaires) neutrophiles diminue en même temps. Ce fait n'offre pas toujours l'évidence frappante de la monocytose, mais, à un degré moins accentué, il est extrêmement fréquent, et les moyennes comparées le démontrent : *avant la vaccination 35,5 p. 100 de lymphocytes* : après deux, trois semaines ou plus, 44 p. 100.

Les variations des éosinophiles ne sont pas très prononcées. Mais, en général, *une tendance à la diminution du nombre des éosinophiles pendant les premières semaines* après la vaccination apparaît évidente. Quelquefois une augmentation postérieure, non seulement rétablit l'équilibre des chiffres normaux, mais dépasse même le point de départ.

Finalement, on peut constater *une déviation à gauche du taux des lobulations nucléaires selon Arneth* (dans les granulocytes neutrophiles). Cette déviation est très prononcée dans quelques cas, en coïncidence avec la troisième à la cinquième semaine après la vaccination. En général, au commencement il y a plutôt une petite augmentation du nombre de lobulations nucléaires, qui, d'ailleurs, chez les enfants nouveau-nés observés par nous, ne rejoint pas toujours, avant la vaccination, le taux normal (de 275). Dans plusieurs cas, du cinquième au septième examen du sang, on retrouve une nouvelle augmentation, une nouvelle poussée à droite (voir les chiffres des groupes A, B, C).

*
* *

Tâchons maintenant d'interpréter ces résultats. Une première question se pose : ces modifications leucocytaires sont-elles vraiment dues à la vaccination ?

Il est évident qu'une réponse définitive à cette question ne pourra être appuyée sur de larges bases statistiques que lorsque nous-mêmes, en poursuivant nos recherches, et d'autres chercheurs, dans des milieux différents, aurons multiplié les observations.

Nous sommes cependant en mesure de dire que des variations telles qu'on peut les observer en examinant les courbes graphiques qui accompagnent ce travail, et qui se répètent, à différents degrés, dans la grande majorité des cas, avec une coïncidence remarquable quant au moment de leur apparition, à leur persistance et à leur évolution dans le sang, ne peuvent qu'obéir à la même cause. Déjà du troisième au cinquième jour après le commencement de la vaccination par le BCG par voie buccale, nous voyons monter le taux des monocytes du chiffre moyen (6,8 p. 100) à 13,5 p. 100 (moyenne de nos 110 cas) : en même temps nous voyons descendre le nombre des granulocytes neutrophiles et s'établir une lymphocytose de 45 p. 100 en moyenne.

Blackfan et Diamond [15] ont publié dernièrement (février 1929) un travail très intéressant sur la signification de la monocytose dans les processus tuberculeux. Ce travail avait été suggéré par les recherches de Cunningham, Sabin, Sugijama et Kindwall, qui remontent à l'année 1925. Ces auteurs [16] avaient fait leurs observations sur des animaux de laboratoire (lapins) et avaient démontré que l'inoculation (injection) de doses variables de bacilles tuberculeux produit en général une néoformation de réticulocytes, leur mobilisation et une augmentation évidente des monocytes dans le sang. Avec les monocytes typiques, on peut observer, dans les cas d'infections massives ou de toxémie, des formes atypiques, pathologiques, de réticulocytes plus ou moins modifiés et de cellules endothéliales. Le diagnostic cytologique de ces éléments a été établi par ces auteurs en employant la méthode des colorations supravitales. Avec cette technique, Cunningham et ses collaborateurs ont trouvé, pour les lapins, *une corrélation constante*

entre l'activité des lésions tuberculeuses et le nombre global de monocytes et réticulocytes plus ou moins altérés dans le sang. Les chiffres de ces éléments montent jusqu'à la limite de 50 p. 100 des leucocytes, et la proportion normale des monocytes aux lymphocytes est invertie.

Dans un travail de l'Institut de Sérologie de Bucarest (1929), Nasta, Blechman et Tunaru [22] ont trouvé, en étudiant pendant une durée de trois à quatorze mois une série de dix-sept cobayes inoculés avec le BCG, une légère polynucléose initiale, passagère, qui fait place à une mononucléose (monocytose) marquée, laquelle va en augmentant jusqu'à 65, 82 p. 100.

Les travaux de Cunningham et Tompkins [17] et de Rogers [18] confirment ces résultats pour l'organisme humain, en particulier pour le sang des enfants. Blackfan et Diamond, par l'étude hématologique de 17 malades, dont 12 avec lésions tuberculeuses graves confirmées par radiographies, réactions à la tuberculine, présence de bacilles, biopsie ou autopsie (5 cas) ont établi un taux moyen de monocytes : 44 p. 100, avec des écarts jusqu'à un maximum de 25. Le rapport monocytes à lymphocytes pouvait être fixé en moyenne à 1 : 1,65. Dans un groupe de 5 malades à monocytose accentuée (jusqu'à 27 p. 100), cette altération leucocytaire a été prise comme symptôme d'infection tuberculeuse active, et celle-ci en effet fut confirmée par les recherches diagnostiques ultérieures. Toutes ces observations ont été pratiquées chez des enfants ou des adolescents, et à ce propos Blackfan et Diamond, s'appuyant sur leurs propres données et sur d'autres, établissent une table des rapports proportionnels des monocytes aux lymphocytes suivant l'âge. La voici :

AGE	NOMBRE des leucocytes par millimètre cube	MONOCYTES		LYMPHOCYTES		PROPORTION monocytes à lymphocytes
		Pourcentage	chiffre absolu	Pourcentage	chiffre absolu	
6 mois.	12.000	5	600	50	6.000	1 : 10
6 mois à 1 an . .	11.000	6	660	44	4.840	1 : 7,3
1 à 4 ans.	9.000	8	720	32	2.880	1 : 4
4 à 12 ans. . . .	9.000	8	720	27	2.430	1 : 3,4
Adultes	8.000	7	560	24	1.920	1 : 3,3

Ces chiffres n'ont rien d'absolu, et il serait puéril de méconnaître la difficulté d'une étude qui puisse conduire à des résultats sûrs et définitifs pour toutes les collectivités humaines, en ce qui se rapporte à la morphologie normale du sang de l'enfant. Cette difficulté dépend de l'instabilité de l'équilibre leucocytaire vis-à-vis des premières excitations d'ordre physico-chimique, alimentaires, bactériennes, etc., lesquelles se greffent subitement sur un fond constitutionnel qui, lui-même, n'a pas encore acquis la fixité ou le caractère qui lui est propre, surtout au point de vue de sa tendance vers un état lymphoïde.

L'un de nous (Pittaluga) s'est occupé il y a vingt-cinq ans de la formule leucocytaire du nouveau-né [19]. Sur la base d'analyses pratiquées quelques heures après la naissance, nous trouvons des chiffres qui, — en tenant compte de la nomenclature très différente employée à cette époque pour la désignation des formes leucocytaires — correspondent aux moyennes suivantes :

	2 H. 1/2 après la naissance	12 HEURES après
Granulocytes neutrophiles.	51,2	58,8
Lymphocytes	40,8	32,7
Monocytes.	6,2	7,5
Eosinophiles.	1,8	2

Zibordi [20], qui a publié en 1925 une excellente monographie, peut-être la plus complète que nous possédions sur l'hématologie normale et pathologique de l'enfant, est d'accord avec nous sur ces points fondamentaux :

1° Que, pendant les premiers temps de la vie extra-utérine, le sang de l'enfant présente un nombre élevé de granulocytes neutrophiles, en tout cas supérieur à celui des lymphocytes (bien que ce dernier soit toujours plus fort que dans le sang des adultes) ;

2° Que les éléments de type monocyttaire ne dépassent jamais, chez le nouveau-né normal, le taux de 8 p. 100 et restent en moyenne entre 5 et 7 p. 100.

Il est évident que les chiffres relevés par nous chez les enfants

vaccinés au BCG., surtout la monocytose précoce et l'élévation de la courbe des lymphocytes, sont en rapport avec la prolifération du virus-vaccin pendant le processus de défense spécifique de l'organisme. Ils correspondent d'une façon impressionnante aux variations leucocytaires, surtout à la monocytose que les auteurs américains (Blackfan, Diamond, Cunningham et ses collaborateurs, Rogers) ont observées et auxquelles ils ont attribué à juste titre une si grande importance dans l'infection tuberculeuse. Ces auteurs ont peut-être exagéré l'importance pronostique de la réaction monocyttaire qu'ils considèrent comme le signe d'une infection *active*. Mais nous ne pouvons pas oublier qu'en effet la réponse des tissus envahis soit par une infection bacillaire spontanée, soit par l'inoculation ou l'ingestion du virus-vaccin vivant, consiste en premier lieu en une néoformation intense d'éléments de type clasmato-cytaire, de réticulocytes, de cellules issues du système réticulo-endothélial, dont Metchnikoff avait entrevu toute l'importance et la signification, précisément dans la lutte de l'organisme contre l'infection bacillaire et qui jouent d'ailleurs un si grand rôle dans la formation du nodule tuberculeux primitif. La mobilisation d'éléments cellulaires de ce type et l'accroissement de leur nombre dans le sang circulant doivent en conséquence être considérés comme *signes de l'activité tissulaire défensive*. A ces premiers signes s'ajoute la *lymphocytose* spécifique. Et ces deux symptômes hématologiques démontrent une fois de plus que la vaccination par le BCG arrive à des résultats prémunisants grâce à un processus défensif actif, de type spécifique et atténué.

Il est très intéressant, à ce propos, de mettre en relief ce fait que *les altérations leucocytaires qui nous occupent se manifestent à un moment de l'évolution du processus prémunisant où il ne peut être question encore de réactions humorales*, comme le démontrent les résultats obtenus par tous les savants qui ont cherché à déterminer la période où commence à s'établir l'état d'allergie.

Nous avons rappelé, dans les premières pages de ce travail, un mémoire de Boer (juillet 1929). Or, Boer arrive à cette conclusion que « les variations dans la composition du sang consécutives à la vaccination par le BCG sont peu importantes,

ce qui est d'accord avec l'intensité faible de l'infection par le BCG » (p. 114, *loc. cit.*, 3). Une telle imprécision, que nous ne saurions admettre, dépend des trois facteurs suivants : 1° du nombre excessivement réduit des cas examinés (9 cas); 2° de la proportion élevée des cas dans lesquels la vaccination a été suivie d'abcès sous-cutanés (5 cas sur 9) qui obligent l'auteur à enlever toute valeur aux variations leucocytaires consécutives; 3° de l'âge des enfants vaccinés, (presque tous entre trois et dix mois, c'est-à-dire alors que l'organisme de l'enfant est sujet à des désordres pathologiques divers (5 cas d'eczéma, 1 cas d'otite, etc. dans ce petit groupe de 9 cas de Boer) qui, à leur tour, modifient l'équilibre leucocytaire. Mais nous trouvons, parmi les cas de Boer, l'observation n° 5, où il s'agit d'un enfant né le 18 juin 1928 et vacciné par voie sous-cutanée le 21 juin, c'est-à-dire trois jours après, avec une dose de 1/50 de milligramme de BCG. C'est peut-être la seule que nous puissions comparer aux nôtres, malgré la différence du procédé de vaccination. Or voici les chiffres des examens hématologiques de ce cas (résumés) :

DATES	NOMBRE de leucocytes	GRANULOCYTES	LYMPHOCYTES	MONOCYTES	ÉOSINOPHILES	CELLULES de Türk
19 juin (BCG)	(Avant la vaccination)	70	24	4	0	0
25 juin	7.300	40	40	16	4	1
4 juillet	14.800	35,5	46	16	1,5	0,5
23 juillet	10.800	30	57,5	9	3	0
6 août	10.350	34	49,5	12,5	4	0,5
20 août	8.650	23	68,5	6,5	2	0
12 septembre	8.650	31	54,5	11,5	3	0
8 octobre	5.520	46	50,5	3,5	0	0

La correspondance — voire l'identité — des variations leucocytaires de ce cas, avec celles de la majorité de nos observations est frappante. Nous y retrouvons la monocytose intense et précoce (sixième jour); la chute des granulocytes (de 70 à 40); la lymphocytose progressive (de 24 à 40, 46, 57, etc.) : et le même cycle d'évolution de ces modifications. Nous n'avons pas voulu renoncer à cette constatation. Peut-être aussi, dans

les cas n° 6 (vacciné à la septième semaine après la naissance) et 10 (vacciné le trentième jour) de Boer, (on rencontre des variations leucocytaires du même type, bien que beaucoup moins évidentes.

Dans un travail très récent (juillet 1929) de Kereszluri et Park [21], qui ont vacciné par le BCG à New-York, 183 sujets comparés avec 280 témoins, sélectionnés entre 721 familles tuberculeuses, nous lisons ceci : « La numération comparée des éléments cellulaires du sang a été faite chez 10 enfants pendant la période de vaccination. Durant les dix premiers jours de la vie, une lymphocytose de 50 p. 100 est considérée comme approximativement normale. Chez nos 10 enfants elle était plus élevée : environ 70 p. 100. Il se peut que cet accroissement proportionnel du nombre des lymphocytes soit dû aux réactions cellulaires vis-à-vis des bacilles-vaccins. Mais la « figure » du sang est si variable dans les premiers jours de la vie qu'il est difficile d'en tirer quelque conclusion (p. 836, *loc. cit*). Nous avons vu que dans nos séries de cas, nous avons rarement noté, pendant la période post-vaccinale, des taux aussi élevés de lymphocytes. Mais, malgré la réserve justifiée de ces auteurs, nous sommes maintenant autorisés à adopter leur interprétation qui vient ainsi à l'appui de nos observations personnelles.

Nous avons laissé de côté, dans cette étude, tout ce qui concerne la présence de cellules pathologiques (cellules de Rieder, cellules d'irritation de Türk, pléocaryocytes de Pittaluga, cellules plasmatisques, etc.) dans le sang des enfants vaccinés. Leurs variations numériques, en tenant compte de leur présence préalable chez une proportion fort élevée d'enfants avant la vaccination, sont trop limitées pour en tirer quelque conclusion. Cela nécessiterait, du moins, de longues comparaisons qui échappent à la finalité concrète de notre travail et que nous réservons pour une autre étude.

CONCLUSIONS.

L'examen comparatif des taux leucocytaires de différents groupes d'enfants vaccinés par voie buccale avec le BCG nous conduit à signaler l'existence à peu près constante d'une

réaction générale caractérisée par une *monocytose précoce* (dès la première semaine) s'élevant au taux de 15 p. 100 en moyenne, accompagnée ou plus souvent suivie par une *lymphocytose prolongée* et par une *diminution correspondante des granulocytes neutrophiles*, avec légère déviation à gauche du nombre des lobulations nucléaires de ces derniers (Arneth).

Ces altérations leucocytaires sont, à notre avis, en rapport avec l'activité défensive de l'organisme vacciné et avec la prolifération du virus-vaccin dans les tissus après passage de celui-ci à travers l'intestin. Elles démontrent que cette activité défensive, grâce à laquelle s'établit l'état de « prémunition » contre l'infection tuberculeuse, s'exerce par les mêmes moyens et suivant le même type de réaction tissulaire et hématique que dans l'infection primitive, mais avec une évolution plus rapide et abrégée, dont nous retrouvons l'expression dans le cycle des modifications leucocytaires du sang.

Ces réactions cellulaires, faciles à mettre en évidence, peuvent servir, en l'absence de réactions tuberculiniques positives, et longtemps avant l'apparition de celles-ci, à contrôler le passage des bacilles-vaccins BCG dans la circulation lymphatique et sanguine. Elles attestent la réalité de l'absorption de ces bacilles-vaccins par le tractus intestinal et, par conséquent, l'existence de la prémunition.

(Madrid, août 1929.)

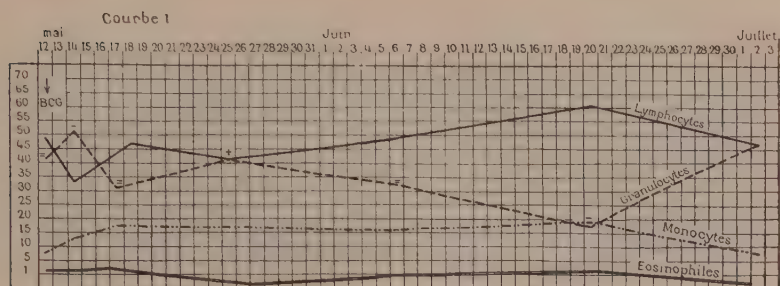


FIG. 1. — Enfant n° 927 (groupe A, n° 3).

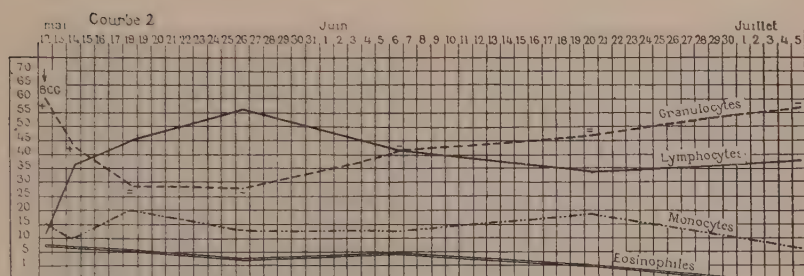


FIG. 2. — Enfant n° 5935 (groupe A, n° 7).

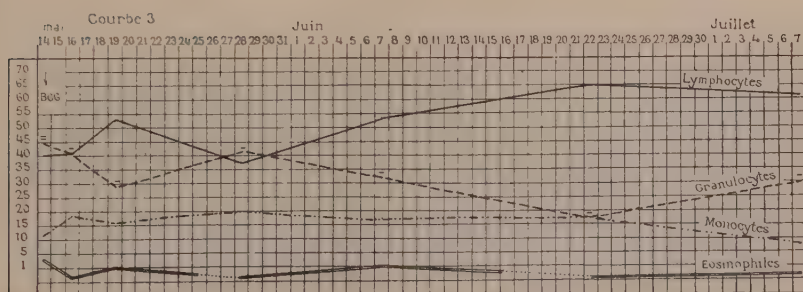


FIG. 3. — Enfant n° 5939 (groupe A, n° 8).

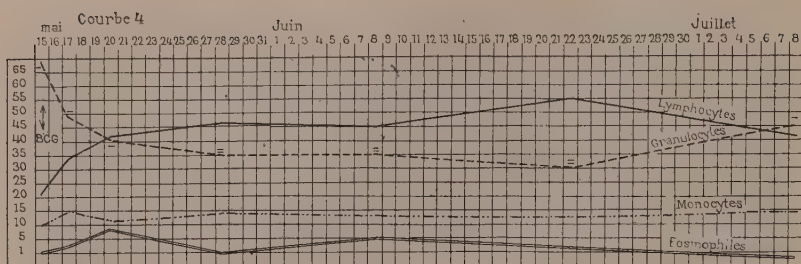


FIG. 4. — Enfant n° 5941 (groupe A, n° 9).

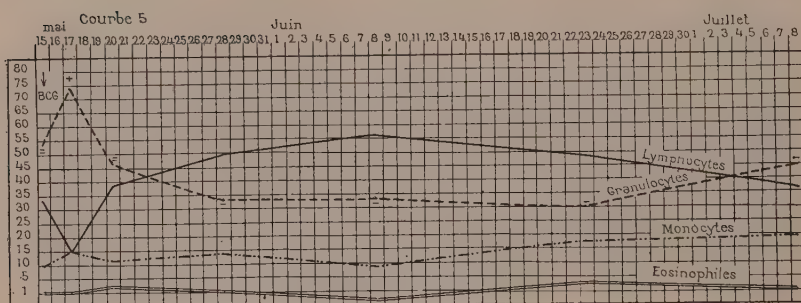


FIG. 5. — Enfant n° 5942 (groupe A, n° 10).

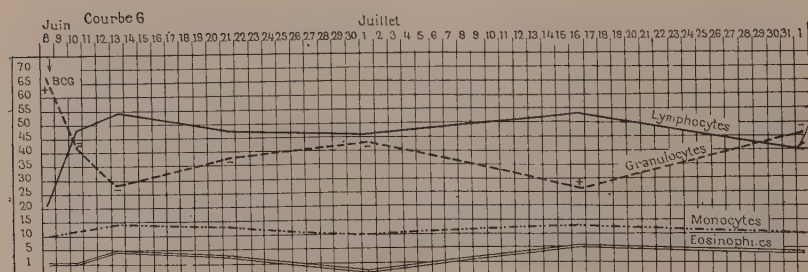


FIG. 6. — Enfant n° 6048 (groupe A, n° 12).

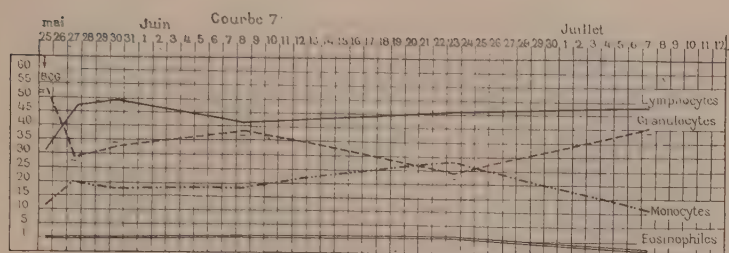


FIG. 7. — Enfant n° 5974 (groupe B, n° 19).

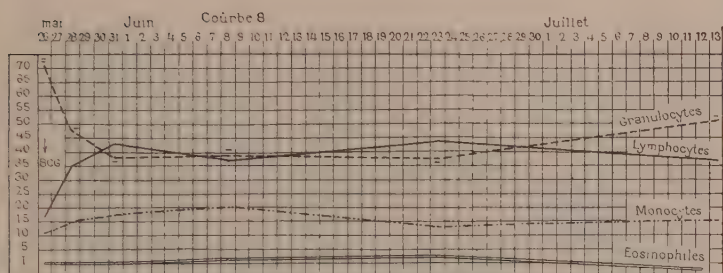


FIG. 8. — Enfant n° 5977 (groupe B, n° 20).

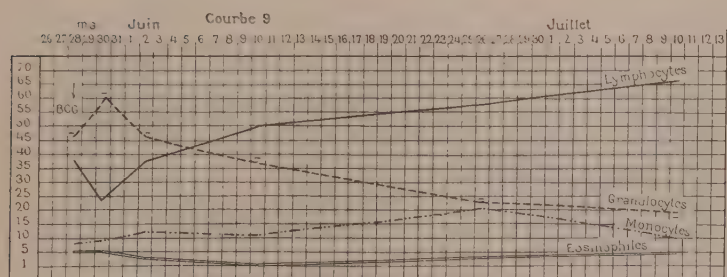


FIG. 9. — Enfant n° 5980 (groupe B, n° 21).

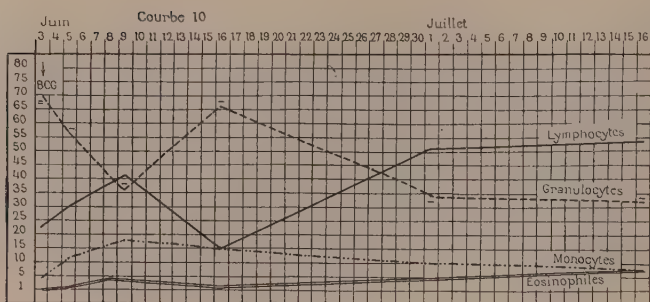


FIG. 10. — Enfant n° 6001 (groupe B, n° 23).

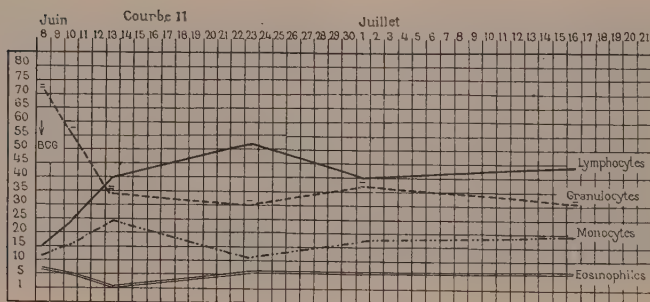


FIG. 11. — Enfant n° 6015 (groupe B, n° 27).

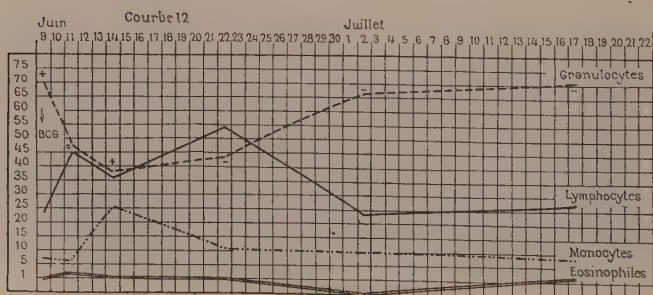


FIG. 12. — Enfant n° 6027 (groupe B, n° 30).

Enfants témoins.

NUMÉRO D'ORDRE	NUMÉRO d'enregistrement (Inclusa-Madrid)	DATES	LYMPHOCYTES pour 100 leucocytes	MONOCYTES pour 100 leucocytes	ÉOSINOPHILES pour 100 leucocytes	GRANULOCYTES neutrophiles pour 100 leucocytes
1	6168	30 juillet 1929. 6 août 1929.	50 63	39 35	9 7	2 2
2	6171	1 ^{er} août 1929. 6 août 1929.	71 51	21 40	7 7	1 2
3	6175	30 juillet 1929. 1 ^{er} août 1929.	55 58	37 30	7 12	1 0
4	6177	1 ^{er} juillet 1929. 6 juillet 1929.	40 43	47 51	9 5	4 1
5	6180	1 ^{er} août 1929. 3 août 1929.	70 55	24 36	5 5	1 3
6	6181	1 ^{er} août 1929. 6 août 1929.	48 43	44 47	10 7	1 2
7	6182	1 ^{er} août 1929. 6 août 1929.	34 52	60 40	4 1	2 6
8	0183	1 ^{er} août 1929. 6 août 1928.	35 51	59 41	2 6	4 1
9	6188	1 ^{er} août 1929. 3 août 1929.	30 57	57 34	8 8	5 1
10	6189	1 ^{er} août 1929. 3 août 1929.	70 62	21 27	6 8	3 4

GROUPÉ A — Enfants vaccinés entre le troisième et le douzième jour après la naissance, pour lesquels on a pratiqué sept (ou plus) examens du sang (mai-juillet 1929). [Le signe P. indique la présence de cellules pathologiques, cellules de Rieder, cellules d'irritation de Türk, pléocaryocytes de Pittaluga, etc.]

NUMÉRO d'ordre	NUMÉRO du registre	DATES des analyses du sang	GRANULOCYTES neutrophiles pour 100 leucocytes	LYMPHOCYTES pour 100 leucocytes	MONOCYTES pour 100 leucocytes	ÉOSINOPHILES pour 100 leucocytes	ARNETH (chiffre des lobulations nucléaires pour 100 polynucléaires)
1	5924	11 mai 1929 (BCG). 13 mai 1929. 16 mai 1929. 24 mai 1929. 4 juin 1929. 19 juin 1929. 52 1 ^{er} juillet 1929.	75 52,5 55 27 27 31 52	21,5 21,5 29 64 57 55 43	4 16,5 15,5 13 44 13 5	0,5 2,5 0,5 0,5 1 1 0	497 225 284 219 210 196 185
2	5923	11 mai 1929 (BCG). 13 mai 1929. 16 mai 1929. 24 mai 1929. 4 juin 1929. 19 juin 1929. 1 ^{er} juillet 1929.	73 75,5 37 58,5 24 26 48	45 41,5 48,5 25,5 55 49 65	4,5 9,5 19 45,5 48 22 16	4 5,5 0,5 3 3 4 2	232 229 217 231 201 178 191
3	5927 (V. courbe 4).	12 mai 1929 (BCG). 14 mai 1929. 17 mai 1929. 25 mai 1929. 6 juin 1929. 20 juin 1929. 2 juillet 1929.	41,5 51,5 33 34 44,5 33 48 47	48,5 33 48 44 49,5 64 46	8,5 13,5 48 17 16,5 49 7	1,5 2 3 0,5 1 2 0	247 231 248 304 246 196 260
4	5929	12 mai 1929 (BCG). 14 mai 1929. 17 mai 1929. 25 mai 1929.	48 44,5 34,5 37	33 36 39,5 48,5	14 41,5 20 12,5	4 5,5 6 2	P. 254 P. 218 P. 253 224

VARIATIONS LEUCOCYTAIRES CHEZ LES ENFANTS VACCINÉS 1235

6	5932	47 mai 1929.	31,5	45,5	4,5	224
		25 mai 1929.	31	44	2	234
		5 juin 1929.	48	44,5	1,5	161
		20 juin 1929.	73,5	43,5	4	P. 227
		2 juillet 1929.	52	43	1,5	224
		17 juillet 1929.	28	16	3	P. 458
		42 mai 1929 (BCG).	53	7	4	215
		14 mai 1929.	63	40,5	4,5	221
		17 mai 1929.	46	17	4	230
		25 mai 1929.	37,5	23	3	P. 233
7	5935 (V. courbe 2).	25 mai 1929.	38	47	3	199
		5 juin 1929.	41	12	4	P. 199
		20 juin 1929.	45,5	22	4	438
		5 juillet 1929.	44	11	4	P. 173
		13 mai 1929 (BCG).	50	44	4	276
		15 mai 1929.	66	45	7	288
		18 mai 1929.	44	40	6	264
		26 mai 1929.	29	20	5	P. 207
		6 juin 1929.	28,5	57,5	2,5	247
		21 juin 1929.	41,5	42,5	4	P. 248
8	5939 (V. courbe 3).	47	33	1	478	
		5 juillet 1929.	56	6	0	P. 244
		14 mai 1929 (BCG).	44,5	41,5	3,5	496
		16 mai 1929.	40,5	18	0	P. 216
		19 mai 1929.	29,5	46,5	4	P. 260
		27 mai 1929.	53	20	0,5	325
		7 juin 1929.	32	17,5	0	P. 485
		22 juin 1929.	47	18	0	141
		7 juillet 1929.	30	8	0	248
		15 mai 1929 (BCG).	67,5	41	1	P. 244
9	5941 (V. courbe 4).	17 mai 1929.	49	45	2	242
		20 mai 1929.	41,5	42	9	221
		28 mai 1929.	36,5	15	1,5	P. 260
		8 juin 1929.	35,5	43,5	5	P. 250
		23 juin 1929.	30,5	12,5	2	P. 236
		8 juillet 1929.	45	14	0	154
		15 mai 1929 (BCG).	54	41	4,5	P. 262
		17 mai 1929.	74,5	40	0,5	270
		20 mai 1929.	47	42,5	2	255
		28 mai 1929.	34,5	14	1	215
10	5942 (V. courbe 5).	8 juin 1929.	34	9,5	0	226
		23 juin 1929.	30	48	3	P. 227
		8 juillet 1929.	49	19	4	212
		45	36			
		15 mai 1929 (BCG).	54	41	4,5	P. 262
		17 mai 1929.	74,5	40	0,5	270
		20 mai 1929.	47	42,5	2	255
		28 mai 1929.	34,5	14	1	215
		8 juin 1929.	50,5	9,5	0	226
		23 juin 1929.	30	48	3	P. 227
8 juillet 1929.	49	19	4	212		

NUMÉRO d'ordre	NUMÉRO du registre	DATES des analyses du sang	GRANULOCYTES neutrophiles pour 100 leucocytes	LYMPHOCYTES pour 100 leucocytes	MONOCYTES pour 100 leucocytes	ÉOSINOPHILES pour 100 leucocytes	ARNETH (chiffre de lobulations nucléaires pour 100 leucocytes)
11	5944	15 mai 1929 (BCG).	65	25,5	6,5	5	P. 239
		17 mai 1929.	38	46,5	42	3,5	P. 237
		20 mai 1929.	35,5	45,5	13	6	P. 250
		28 mai 1929.	35,5	57,5	6,5	0,5	P. 220
		8 juin 1929.	50	39	40	4	P. 226
		23 juin 1929.	41	43	15	4	238
		8 juillet 1929.	54	38	8	0	169
12	6018 (V. courbe 6).	8 mai 1929 (BCG).	68	21	40	1	P. 287
		10 juin 1929.	41	47	11	1	271
		13 juin 1929.	28	54	14	4	235
		21 juin 1929.	38	47	13	2	238
		1 ^{er} juillet 1929.	44	46	40	0	274
		16 juillet 1929.	26	54	14	6	276
		1 ^{er} août 1929.	46	40	10	4	234

GRUPE B. — Enfants vaccinés entre le troisième et le douzième jour après la naissance, pour lesquels on a pratiqué six analyses du sang (mai-août 1929). [Le signe P. indique : présence d'éléments cellulaires pathologiques]

NUMÉRO d'ordre	NUMÉRO du registre	DATES des analyses du sang	GRANULOCYTES neutrophiles pour 100 leucocytes	LYMPHOCYTES pour 100 leucocytes	MONOCYTES pour 100 leucocytes	ÉOSINOPHILES pour 100 leucocytes	ARNETH (chiffre de lobulations nucléaires pour 160 polynucléaires)
(4) 43	5926	12 mai 1929 (BCG).	60	33	5,5	1,5	209
		14 mai 1929.	56	33,5	11,5	0	246
		17 mai 1929.	38,5	45,5	13	2	P. 226
		27 mai 1929.	34,5	52	12,5	4	243
		9 ^{er} mai 1929.	34,5	52	12,5	4	243

(3)	15	5948	16 mai 1929. 19 mai 1929. 27 mai 1929. 7 juin 1929. 22 juin 1929. 18 mai 1929 (BCG). 23 mai 1929. 27 mai 1929. 4 juin 1929. 19 juin 1929. 7 juillet 1929.	31 54 57 45,5 46 60 57,5 26 34 34,5 34,5 25	25,5 34,5 25 40,5 41 30 34,5 61,5 53 47,5 47,5 64	9,5 9,5 43 12 14 8,5 9,5 10,5 42 46,5 45,5 9	8 2 5 2 0 1,5 1,5 2 1 1,5 1,5 2	P. P. P. P. P. P. P. P. P. P. P. P.	223 230 281 199 189 212 282 280 255 219 187 252
(4)	16	5951	18 mai 1929 (BCG). 23 mai 1929. 27 mai 1929. 4 juin 1929. 19 juin 1929. 7 juillet 1929.	34 21 29 52 34,5 29	49 57 60,5 34,5 45 59	45 49 40 13,5 24,5 11	2 3 0,5 0 1 1	P. P. P. P. P. P.	311 224 211 239 196 258
(5)	17	5955	22 mai 1929 (BCG). 24 mai 1929. 27 mai 1929. 4 juin 1929. 19 juin 1929. 5 juillet 1929.	45 52 63 38,5 38,5 35	34 33 31 47,5 50,5 50	19 40 5 44 40 14	2 3 1 0 1 1	P. P. P. P. P. P.	282 258 248 265 286 230
(6)	18	5960	22 mai 1929 (BCG). 24 mai 1929. 27 mai 1929. 30 mai 1929. 7 juin 1929. 22 juin 1929.	40 32,5 31,5 36,5 22,5 46	49 58 60 54 60,5 39	10 9 7,5 9 13 43	1 1 1 0,5 4 2	P. P. P. P. P. P.	256 245 230 208 219 212
(7)	19	5974 (V. courbe 7).	25 mai 1929 (BCG). 27 mai 1929. 1er juin 1929. 8 juin 1929. 23 juin 1929. 7 juillet 1929.	54 29 30 39 24 44	34 47,5 52 41 46 48	43,5 20,5 17,5 18,5 27,5 11	1,5 0,5 0,5 1,5 2,5 0	P. P. P. P. P. P.	224 225 248 244 249 200
(8)	26	5977 (V. courbe 8).	26 mai 1929 (BCG). 8 mai 1929. 31 mai 1929. 8 juin 1929. 23 juin 1929. 13 juillet 1929.	74,5 48,5 38,5 39,5 38,5 50	17 35 43 37,5 44,5 35	11 45,5 47,5 20,5 14 15	0,5 1 4 4,5 3 0	P. P. P. P. P. P.	276 235 188 177 184 219

NUMÉRO d'ordre	NUMÉRO du registre	DATES des analyses du sang	GRANULOCYTES neutrophiles pour 100 leucocytes	LYMPHOCYTES pour 100 leucocytes	MONOCYTES pour 100 leucocytes	ÉOSINOPHILES pour 100 leucocytes	ANNETH (chiffre des lobulations nucléaires pour 100 polynucléaires
(9) 21	5980 (V. courbe 9).	28 mai 1929 (BCG).	46,5	38,5	8,5	6,5	209
		30 mai 1929.	60,5	24	10	5	246
		2 juin 1929.	46,5	31,5	13,5	2,5	210
		10 juin 1929.	37,5	50,5	12	0,5	174
		26 juin 1929.	22	57	20	4	497
		10 juillet 1929.	49	66	10	5	218
(10) 22	5988	30 mai 1929 (BCG).	45,5	33,5	19,5	1,5	P. 498
		1 ^{er} juin 1929.	46	37	45	2	P. 214
		4 juin 1929.	43,5	39,5	45	2	P. 228
		12 juin 1929.	30	53	15	2	P. 489
		27 juin 1929.	23	63	13	4	P. 499
		15 juillet 1929.	43	44	12	1	220
(11) 23	5989	30 mai 1929 (BCG).	43	42	6	1,5	259
		1 ^{er} juin 1929.	52	37	10	1	221
		4 juin 1929.	44	32	22	2	237
		7 juin 1929.	31	49	47	3	223
		12 juin 1929.	37	47	14,5	1,5	P. 245
		27 juin 1929.	37	52	10	1	P. 216
(12) 24	5992	1 ^{er} juin 1929 (BCG).	46,5	38,5	14	1	P. 230
		3 juin 1929.	37,5	45	16	0	P. 236
		6 juin 1929.	46,5	33,5	47	2	P. 222
		14 juin 1929.	24	60	15	1	233
		29 juin 1929.	32,5	59	6	2,5	284
		13 juillet 1929.	34	47	19	0	168
(13) 25	6001 (V. courbe 10).	3 juin 1929 (BCG).	70,5	23,5	4,5	1,5	P. 251
		5 juin 1929.	56,5	30,5	11	2	P. 222
		8 juin 1929.	36,5	44,5	18	4	274
		16 juin 1929.	66	46,5	46	1,5	215

(45) 27	6045 (V. courbe 41).	<p>14 juin 1929. 27</p> <p>44 juin 1929. 33</p> <p>49 juin 1929. 29</p> <p>30 juin 1929. 24</p> <p>14 juillet 1929. 43</p>	<p>53</p> <p>48</p> <p>56</p> <p>60</p> <p>78</p>	<p>45</p> <p>14</p> <p>14,5</p> <p>14</p> <p>8</p>	<p>291</p> <p>P. 234</p> <p>236</p> <p>232</p>
(46) 28	6023	<p>8 juin 1929 (BCG). 71</p> <p>40 juin 1929. 57</p> <p>43 juin 1929. 34</p> <p>23 juin 1929. 30</p> <p>1^{er} juillet 1929. 37</p> <p>16 juillet 1929. 34</p>	<p>45</p> <p>23</p> <p>40</p> <p>52</p> <p>40</p> <p>44</p>	<p>12</p> <p>45</p> <p>24</p> <p>12</p> <p>47</p> <p>49</p>	<p>P. 243</p> <p>234</p> <p>284</p> <p>235</p> <p>P. 238</p> <p>218</p>
(47) 29	6026	<p>9 juin 1929 (BCG). 40</p> <p>44 juin 1929. 44</p> <p>14 juin 1929. 32</p> <p>24 juin 1929. 30,5</p> <p>5 juillet 1929. 50</p> <p>20 juillet 1929. 26</p>	<p>39</p> <p>40</p> <p>45</p> <p>48,5</p> <p>33</p> <p>39</p>	<p>49,5</p> <p>44</p> <p>22</p> <p>47,5</p> <p>16</p> <p>13</p>	<p>P. 269</p> <p>P. 290</p> <p>247</p> <p>287</p> <p>234</p> <p>266</p>
(48) 30	6027 (V. courbe 42).	<p>9 juin 1929 (BCG). 50</p> <p>44 juin 1929. 69</p> <p>14 juin 1929. 45</p> <p>22 juin 1929. 47</p> <p>2 juillet 1929. 58</p> <p>47 juillet 1929. 67</p>	<p>32</p> <p>49</p> <p>33</p> <p>37</p> <p>30</p> <p>22</p>	<p>16</p> <p>8</p> <p>20</p> <p>43</p> <p>42</p> <p>40</p>	<p>P. 231</p> <p>258</p> <p>208</p> <p>P. 251</p> <p>206</p> <p>218</p>
(49) 31	6850	<p>9 juin 1929 (BCG). 68</p> <p>44 juin 1929. 47</p> <p>44 juin 1929. 38</p> <p>22 juin 1929. 34</p> <p>2 juillet 1929. 67</p> <p>47 juillet 1929. 71</p>	<p>23</p> <p>45</p> <p>36</p> <p>34</p> <p>27</p> <p>49</p>	<p>7</p> <p>6</p> <p>25</p> <p>11</p> <p>40</p> <p>8</p>	<p>288</p> <p>243</p> <p>267</p> <p>234</p> <p>474</p> <p>239</p>
		<p>18 juin 1929 (BCG). 42</p> <p>20 juin 1929. 31</p> <p>23 juin 1929. 40</p> <p>1^{er} juillet 1929. 32</p> <p>44 juillet 1929. 25</p> <p>26 juillet 1929. 32</p>	<p>40</p> <p>51</p> <p>39</p> <p>51</p> <p>65</p> <p>59</p>	<p>43</p> <p>46</p> <p>20</p> <p>43</p> <p>3</p> <p>7</p>	<p>P. 256</p> <p>253</p> <p>P. 286</p> <p>277</p> <p>240</p> <p>260</p>

GRUPPE C. — Enfants vaccinés entre le troisième et le douzième jour après la naissance et pour lesquels on a pratiqué cinq analyses du sang (juin-août 1929). [Le signe P indique : présence de cellules pathologiques]

NUMÉRO d'ordre	NUMÉRO du registre	DATES des analyses du sang	GRANULOCYTES neutrophiles pour 100 leucocytes	LYMPHOCYTES pour 100 leucocytes	MONOCYTES pour 100 leucocytes	ÉOSINOPHILES pour 100 leucocytes	ARNETH (chiffre des lobulations nucléaires pour 100 polynucléaires)
(1) 32	5922	11 mai 1929 (BCG). 13 mai 1929. 16 mai 1929. 24 mai 1929. 4 juin 1929.	73 56 46,5 34 44,5	15,5 33 39,5 55 45,5	7,5 9,5 11,5 10 9	2 1,5 2,5 1 1	240 253 243 225 P. 208
(2) 33	5928	12 mai 1929 (BCG). 14 mai 1929. 17 mai 1929. 25 mai 1929. 5 juin 1929.	57 64 55 42 34	32,5 18 28 48,5 54,5	8,5 13 15 9,5 11,5	2 4 2 0 0	P. 249 233 248 231 199
(3) 34	5937	14 mai 1929 (BCG). 16 mai 1929. 19 mai 1929. 27 mai 1929. 7 juin 1929.	39 36,5 29 39 33	43,5 41 45 47,5 53	17,5 18,5 24,5 12,5 14	0 3 1,5 1 0	P. 237 P. 204 P. 195 P. 182 210
(4) 35	5943	15 mai 1929 (BCG). 17 mai 1929. 20 mai 1929. 28 mai 1929. 8 juin 1929.	50,5 44,5 32 36 40,5	34 40,5 51 55,5 47,5	13,5 12,5 10 6,5 11	1,5 1,5 7 2 1	231 P. 286 273 P. 202 252
(5) 36	5967	23 mai 1929 (BCG). 25 mai 1929. 28 mai 1929. 5 juin 1929. 20 juin 1929.	37,5 42,5 28 30,5 38	51,5 41 58 56,5 50	8,5 16 13 12,5 11,5	2,5 0,5 1 0,5 0,5	P. 259 240 P. 239 P. 242 P. 217
(6) 37	5975	25 mai 1929 (BCG). 27 mai 1929.	56 54	35 30	7 14,5	2 1,5	322 250 P. 209

NUMÉRO d'ordre	NUMÉRO du registre	DATES des analyses du sang	GRANULOCYTES neutrophiles pour 100 leucocytes	LYMPHOCYTES pour 100 leucocytes	MONOCYTES pour 100 leucocytes	ÉOSINOPHILES pour 100 leucocytes	ARNETH (chiffres des lobulations nucléaires pour 100 polynucléaires)
(15) 46	6024	10 juin 1929 (BCG). 12 juin 1929. 15 juin 1929. 23 juin 1929. 3 juillet 1929.	40 22 40 37 32	42 61 50 42 50	16 15 9 20 16	2 2 4 1 2	301 200 467 496 226
(16) 47	6041	18 juin 1929 (BCG). 20 juin 1929. 23 juin 1929. 1 ^{er} juillet 1929. 11 juillet 1929.	38,5 42 33,5 24 33	47,5 46 40,5 53 57	14 9 22,5 21 9	0 3 3,5 2 4	180 200 P. 235 P. 203 P. 263
(17) 48	6047	18 juin 1929 (BCG). 20 juin 1929. 23 juin 1929. 1 ^{er} juillet 1929. 11 juillet 1929.	32 47 37,5 47 36	53 35,5 47,5 44 50	14 16 14,5 40 11	1 1,5 0,5 2 3	284 240 239 P. 259 268
(18) 49	6048	18 juin 1929 (BCG). 20 juin 1929. 23 juin 1929. 1 ^{er} juillet 1929. 11 juillet 1929.	56 42 33 28 31	36 48 51 54 51	7 8 14 17 16	1 2 5 1 2	231 241 254 220 243
(19) 50	6053	18 juin 1929 (BCG). 20 juin 1929. 23 juin 1929. 1 ^{er} juillet 1929. 11 juillet 1929.	47,5 24 53 34 46	35,5 36 26 54 39	14,5 18 18,5 14 12	2,5 2 2,5 1 3	P. 240 233 177 231 247
(20) 51	6056	18 juin 1929 (BCG). 20 juin 1929. 23 juin 1929.	38 48 51	46 43 33	15 8 14	1 4 2	288 P. 274 277 49

VARIATIONS LEUCOCYTAIRES CHEZ LES ENFANTS VACCINÉS 1263

(22)	53	6060	18 juin 1929 (BCG). 20 juin 1929. 22 juin 1929. 24 juin 1929. 1 ^{er} juillet 1929. 11 juillet 1929.	43,5 42 41 41 37 54	39,5 41 41 41 51 37	10 11 14 10 9	5 2 1 2 0	P. 281 280 250 197 178
(23)	54	6064	20 juin 1929 (BCG). 22 juin 1929. 25 juin 1929. 3 juillet 1929. 13 juillet 1929.	42 39 35,5 26 36,5	32 37 39,5 35 48,5	22,5 17 20,5 19 10,5	3,5 4 4,5 0 5,5	248 261 256 203 186
(24)	55	6063	23 juin 1929 (BCG). 25 juin 1929. 28 juin 1929. 5 juillet 1929. 15 juillet 1929.	48 37 42,5 45 39	34 48 42,5 37 47	14 12 13,5 16 12	4 3 2,5 2 2	P. 256 259 495 211 228
(25)	56	6078	23 juin 1929 (BCG). 25 juin 1929. 28 juin 1929. 5 juillet 1929. 15 juillet 1929.	68,5 36 59 51 35	19,5 51 26 38 54	9 40 14 17 11	3 3 1 4 0	273 265 227 248 236
(26)	57	6088	29 juin 1929 (BCG). 1 ^{er} juillet 1929. 4 juillet 1929. 12 juillet 1929. 27 juillet 1929.	58 73 26 37 39	34 20 60 49 40	6 7 13 11 21	2 0 1 3 0	267 270 246 292 262
(27)	58	6089	2 juillet 1929 (BCG). 4 juillet 1929. 7 juillet 1929. 15 juillet 1929. 26 juillet 1929.	35 43 37 53 47	47 46 46 36 41	15 10 16 11 11	3 1 1 0 1	304 290 244 236 262
(28)	59	6092	2 juillet 1929 (BCG). 4 juillet 1929. 7 juillet 1929. 15 juillet 1929. 26 juillet 1929.	45 71 56 33 39	32 21 34 47 46	49 7 9 13 12	4 4 4 5 3	243 259 266 280 250
			3 juillet 1929 (BCG). 5 juillet 1929. 8 juillet 1929. 18 juillet 1929. 26 juillet 1929.	60 53 34 46 54	32 32 53 42 34	8 19 42 13 10	0 2 1 3 2	P. 204 217 174 152 261

Nous donnerons pour le groupe D les chiffres du premier examen (avant la vaccination) et ceux du quatrième examen vingt à trente jours après, pour éviter de surcharger les tableaux.

GRUPE D. --- Enfants vaccinés dans les mêmes circonstances que les précédents, mais pour lesquels on a fait jusqu'à présent seulement quatre analyses du sang (juin-juillet 1929).

NUMÉRO d'ordre	PREMIÈRE ANALYSE (avant la vaccination)				QUATRIÈME ANALYSE (20 à 30 jours après la première analyse)			
	Granulocytes neutrophiles (p. 100)	Lymphocytes (p. 100)	Monocytes (p. 100)	Eosinophiles (p. 100)	Granulocytes neutrophiles (p. 100)	Lymphocytes (p. 100)	Monocytes (p. 100)	Eosinophiles (p. 100)
1	40	47	40	3	38	45	43	4
2	42	40	49	1	32	44	23	1
3	33	54	42	1	43	44	43	0
4	44	46	40	0	30	56	43	1
5	33	50	16	1	47	36	45	2
6	49	36	43	2	28	40	31	1
7	53	31	43	3	43	41	15	1
8	50	40	4	6	31	50	46	3
9	61	34	5	0	40	42	44	4
10	35	50	41	4	53	29	18	0
11	43	33	22	2	36	53	40	1
12	55	37	6	2	67	42	20	1
13	64	27	6	3	32	52	46	0
14	30	60	8	2	30	47	21	2
15	37	48	43	0	30	54	40	6
16	76	17	6	1	38	53	8	1
17	38	54	7	1	34	46	48	2
18	50	31	18	1	27	53	20	0
19	87	8	4	3	35	57	8	3
20	63	28	6	1	43	40	17	0
21	62	32	5	1	39	46	21	4
22	58	34	6	2	41	41	16	3
23	56	32	40	2	40	46	43	1
24	60	32	4	4	48	39	20	3
25	62	30	6	2	21	65	43	3
26	42	45	12	1	29	57	43	1
27	27	53	15	5	35	51	43	1
28	58	36	5	1	38	44	18	1
29	62	30	6	2				0

Les chiffres moyens qui correspondent aux deux analyses de sang de l'ensemble des 29 cas, compris dans ce groupe D, sont les suivants :

	1 ^{er} ANALYSE (avant la vaccination) p. 100	4 ^e ANALYSE (3 à 4 semaines après la vaccination) p. 100
Granulocytes neutrophiles.	51,25	40,45
Lymphocytes	38,18	42,30
Monocytes.	8,85	15,95
Eosinophiles.	2,72	1,60

Nous renvoyons à une publication ultérieure l'exposé et l'étude des chiffres qui correspondent au groupe E, pour lequel on n'a pu pratiquer jusqu'à présent que trois analyses du sang ; la première avant la vaccination et les deux suivantes respectivement au troisième et au cinquième jours après la vaccination (13 observations). Qu'il nous soit néanmoins permis de dégager ce fait extrêmement intéressant, à savoir que les variations, quelquefois très accentuées, se manifestent déjà à partir du troisième examen (cinq jours après la vaccination) dans le sens de l'augmentation brusque des monocytes. Voici le taux moyen des monocytes de ces 13 observations du groupe E, pour l'analyse antérieure à la vaccination et pour la troisième analyse :

	POURCENTAGE
Avant la vaccination.	9,85
Cinq jours après (3 ^e analyse)	15,20

La comparaison avec le groupe F est importante, parce qu'il s'agit d'enfants issus d'un milieu différent et vivant dans leur famille. Le service de vaccination et de surveillance de ces enfants est fait, comme nous l'avons dit, par le personnel de l'École Nationale de Puériculture. Nous ne reproduisons pas toutes les observations hématologiques des 10 cas étudiés. Mais voici les moyennes

LES DATES VARIENT du 5 mars au mois de mai 1929	1 ^{er} ANALYSE (avant la vaccination) p. 100	2 ^e ANALYSE (3 à 5 jours après) p. 100	3 ^e ANALYSE (10 jours après) p. 100	4 ^e ANALYSE (10 jours après) p. 100	5 ^e ANALYSE (15 jours après) p. 100
Granulocytes neutrophiles	53,80	41,20	40	38,60	46
Lymphocytes	34,60	42,70	44,5	45	41,5
Monocytes.	8,90	12,90	14,5	15,12	11,5
Eosinophiles	2,70	3,20	3	1,28	1

Nous donnons dans le tableau suivant les résultats de deux observations successives espacées de trois à six jours l'une de l'autre, du groupe G

c'est-à-dire de 10 enfants nouveau-nés, pris au hasard à la « Includa » et *non vaccinés* (témoins).

Les moyennes, telles qu'elles résultent de ces vingt observations hématologiques, sont les suivantes :

	1 ^{re} ANALYSE p. 100	2 ^e ANALYSE p. 100
Granulocytes neutrophiles.	51,2	51,6
Lymphocytes	40,6	39,1
Monocytes.	6,2	6,3
Eosinophiles	1	3

BIBLIOGRAPHIE

- [1] CALMETTE (A.), La vaccination préventive de la tuberculose par le BCG (Paris, Masson, édit., 1918. Rapport présenté à la Conférence Internat. réunie à Paris du 15 au 18 octobre 1928).
- [2] CALMETTE (A.), GUÉRIN (C.), BIRAUD (Y.), Vaccination antituberculeuse par le BCG (Documents C. H. 745 : 1 vol. de 136 p., Soc. des Nations, 1928).
- [3] BOER (H. D.), Parenterale Toedienine van BCG (N. V. Boek, en Steendrukkery Eduard Ijdo, Leiden, 11 juillet 1929).
- [4] WALLGREN (Arvid), Résultats de la vaccination intracutanée contre la tuberculose au moyen du BCG. Ces *Annales*, 43, n° 6, juin 1929).
- [5] HYÉRONIMUS (R. G.), Contribution à l'étude clinique du BCG. *Thèse de Paris*, Soc. génér. d'imprimerie, 71, rue de Rennes, 1929.
- [6] JAKENIS, La vaccination des nouveau-nés par le BCG d'après les documents de la Commission ukrainienne. Ces *Annales*, Paris, avril 1929.
- [7] SAYÉ (Luis), La conferencia para el estudio de la vacunación antituberculosa con el BCG y nuestras observaciones durante cuatro años de aplicación al niño. *Rev. med. de Barcelona*, 1929.
- [8] ALONSO MUNOYERRO (J. A.), Nuestros primeros ensayos sobre vacunación tuberculosa con BCG en 757 casos, *La Medicina Ibero*, 9 mars 1929.
- [9] Voir en particulier : W. PAGEL : Die Allgemeinen Pathomorphologischen Grundlagen der Tuberkulose. Berlin, J. Springer, édit., 1927, 1 vol. de 176 p., p. 11 à 20.
- [10] BERGEL (S.), Die Lymphocytose : ihre experimentelle Begründung und biologisch. Klinische Bedeutung, Berlin, 1929.
- [11] Nous citerons entre les meilleures études sur la formule leucocytaire des tuberculeux : F. JIMENEZ ASUA, *Arch. espan. de Tisiologia*, 2 mai 1920, avec bonne bibliographie de 118 ouvrages.
- [12] GIUCA (M.), FRANCKE (M.) et VITNER-ROSENTHAL, Au sujet de la vaccination BCG et de son innocuité. Ces *Annales*, 43, 2 février 1929.
- [13] CALMETTE (A.), La vaccination préventive contre la tuberculose par le BCG. Masson et C^{ie}, édit., 1927, 1 vol. de 252 p.
- [14] JENSEN (K. A.), MORCH (J. R.) et ØRSKOV (J.), Recherches sur la virulence du bacille Calmette-Guérin. Ces *Annales*, juin 1929.

- [15] KENNETH, D. BLACKFAN et DIAMOND (L. K.), The Monocyte in Active Tuberculosis. *Amer. Journ. Diseases of Children*, Chicago, février 1929, p. 233.
- [16] CUNNINGHAM (R. R.), SABIN (F. R.), SUGIYAMA et KINDWALL (J. A.), Role of the Monocyte in Tuberculosis. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, octobre 1925.
- [17] CUNNINGHAM (R. R.) et TOMPKINS (S. H.), White Blood Cells in Human Tuberculosis. *Amer. Rev. Tubercul.*, mars 1928.
- [18] ROGERS (Philip M.), A Study of the Blood Monocyte in Children with Tuberculosis. *New England Journ. Med.*, 1928, 198, 740).
- [19] PITTALUGA (G.), Sobre la formula hemoleucocitaria de los recién nacidos. *La Medic. de los niños*, Barcelona, 1904.
- [20] FERRUCCIO ZIBORDI, Ematologia infantile normale e patologica l. t. de 480 pages (avec bibliographie très complète). Milano, Soc. Anon., Instituto Editor Scientific., 1925.
- [21] KERESZTURI (C.) et PARK (W. H.), Sur la vaccination humaine contre la tuberculose par le BCG dans la ville de New-York. *Ces Annales*, n° 7, juillet 1929.
- [22] NASTA (M.), BLECHMAN (M.) et TUNARU (C.), Modifications du nombre des leucocytes et de la formule leucocytaire chez le cobaye infecté avec le bacille bilité de Calmette-Guérin. *C. R. Soc. de Biol. roumaine*, 101, n° 18, 2 mai 1929.

INJECTION INTRACÉRÉBRALE DU VIRUS VACCINAL CHEZ LE SINGE. PROPRIÉTÉS DE LA NEUROLAPINE

par H. ALDERSHOFF, A. B., F. A. PONDMAN et A. W. POT.

(*Institut Sérologique de l'État hollandais à Utrecht.*)

Les ouvrages traitant de la matière ne répondent pas nettement à la question de savoir si le cerveau des singes est sensible au virus vaccinal.

Levaditi et Nicolau déclaraient en 1923. « Le singe est sensible à l'inoculation cutanée de la neurovaccine, mais supporte sans réagir l'injection intracérébrale du même virus ». L'affinité neurotrope de leur neurovaccin, qui alors (1921 et 1922) n'avait été adapté que peu de temps au cerveau des lapins, était, selon eux, trop faible.

Quatre ou cinq ans plus tard, lorsque leur neurovaccin eut effectué plus de 500 passages sur le lapin, ils constatèrent qu'un chimpanzé et quelques singes inférieurs succombaient, cinq à huit jours après une injection de neurovaccin, à une infection vaccinale du névraxe.

Ils signalaient à l'occasion de ces expériences que : « l'ensemble de ces constatations prouve que notre neurovaccin, avirulent par voie cérébrale pour les simiens inférieurs alors qu'il n'avait subi qu'un nombre restreint de passages sur le lapin, a acquis depuis une virulence accusée, *sans doute par suite de son adaptation au névraxe*. A l'heure actuelle ce neurovaccin confère au chimpanzé et aux catarrhiniens inférieurs (*Cynocephalus hamadryas*) une névraxite mortelle, avec pullulation de germes dans tout le système nerveux central, à la condition toutefois, que le virus soit introduit directement dans le cerveau ».

Il résulte donc nettement de ces termes que le passage répété sur le lapin expliquerait, selon eux, pourquoi leurs singes

furent d'abord réfractaires et plus tard sensibles aux injections intracérébrales ; c'est seulement après que le virus vaccinal avait acquis, par ces passages, une affinité suffisante pour le système nerveux central, un neurotropisme suffisant, qu'il pouvait agir sur le cerveau des singes.

Cette conclusion ne serait pleinement admissible que s'ils avaient au préalable démontré :

1° Que, pour le reste, les propriétés du neurovaccin et en particulier la virulence générale n'étaient pas modifiées par les passages répétés. Bien qu'il n'ait pas été fait mention de données quantitatives tout à fait exactes, le neurovaccin utilisé par eux, le 22 octobre 1926, pour l'injection intracérébrale d'un chimpanzé était très virulent : « l'activité pathogène pour le lapin, par voie cérébrale, correspondait à 1/10.000.000 » ;

2° Que le dermovaccin ou testivaccin, qui n'a jamais été cultivé dans le névraxe, dilué proportionnellement à la virulence injecté dans le cerveau de singes, n'a pas entraîné d'encéphalite vaccinale.

Levaditi et Nicolau n'ont pas prouvé la suggestion qu'ils proposent selon laquelle il faut une adaptation progressive du virus vaccinal au névraxe pour produire chez les macaques une encéphalite vaccinale. S'ils n'ont pas fait de contrôle au moyen d'injections de dermovaccin ou de testivaccin, cela est dû probablement aux expériences de Marie qui avait établi que le dermovaccin n'a pas de prise sur le cerveau des singes.

Marie n'était pas en état de prouver que la mort des lapins ayant subi une injection intracérébrale de dermovaccin était attribuable à l'action du virus vaccinal, attendu qu'il n'avait pu produire de pustules vaccinales au moyen de la substance cérébrale des animaux ayant succombé à une injection intracérébrale.

Comme la notion d'affinité neurotrope a été de plus en plus ébranlée par les expériences subséquentes, et que de notre côté nous n'en avons jamais constaté de preuves convaincantes, nous estimons qu'il est utile de rechercher quelle est la sensibilité du système nerveux central des singes (*Macacus cynomolgus*) à différentes espèces de vaccins (dermovaccin, testivaccin, neurovaccin).

Les tableaux qui suivent donnent un aperçu de ces recherches.

Il convient de faire remarquer que toujours, pour la constatation du virus vaccinal dans le cerveau des singes morts à la suite de l'injection intracérébrale, nous avons fait usage de substance provenant de l'hémisphère non injecté, de sorte qu'il ne pouvait être question d'un transport du vaccin primitif. Les cerveaux furent toujours examinés au point de vue de l'infection bactérienne et apparurent stériles également après l'injection de dermovaccin, chose que d'ailleurs l'autopsie avait déjà fait prévoir. On n'a trouvé aucun signe de phénomènes inflammatoires plus violents des méninges ou du canal d'injection. L'analyse histologique du point d'injection a offert le tableau qu'ont décrit Levaditi et Nicolau : à côté d'un foyer circonscrit (pustule cérébrale), une méningite diffuse, image correspondant à celle de l'encéphalite vaccinale chez le lapin.

Pour les injections intracérébrales nous avons utilisé :

1° De la neurolapine, qui avait passé 312 fois sur des lapins, primitivement originaire de Gallardo, titrant, d'après Groth, 1/1.000.000 ;

2° Neurolapine R. I., provenant du lapin 87 E, qui avait reçu une injection intracérébrale d'une émulsion du testicule du lapin 69 E, inoculé dans les testicules avec une émulsion cérébrale d'un enfant mort d'encéphalite postvaccinale ; ce vaccin n'avait donc passé que sur deux cerveaux, une fois chez l'enfant et une fois chez le lapin 69 E (1).

3° Testivaccin d'un singe, obtenu en inoculant les testicules du singe n° 4 avec du dermo vaccin ;

4° Testilapine, obtenue en inoculant les testicules d'un lapin avec du dermovaccin et en faisant ensuite 6 passages sur testicules ; titrant, d'après Groth, 1/25.000 ;

5° Dermovaccin Amsterdam, titrant, d'après Groth, 1/1.000.

6° Dermovaccin Institut Kitasato, titrant d'après Groth, 1/200.000 ;

7° Dermovaccin desséché du Professeur Paschen, Hambourg, titrant, d'après Groth, 1/1.000.

En général l'injection comportait 0 c. c. 5 d'une dilution faite en proportion de la virulence du vaccin.

(1) ALDERSHOFF, Recherches faites sur un cas d'encéphalite post-vaccinale (Monographie publiée par le Président du Conseil d'Hygiène hollandais 1929).

Comme Levaditi et Nicolau avaient toujours employé de hautes doses dans leurs injections couronnées de succès, par exemple 0 c. c. 5 d'une dilution de 1/20, nous aussi nous avons utilisé des émulsions denses de testilapine à 1/5. Le dermovaccin Amsterdam peu virulent ne fut pas dilué plus que ne l'exigeait la proportion de glycérine. Cependant la virulence fut tellement réduite que le processus se déroula lentement et que le singe 22 ne succomba qu'après huit jours. Avec le dermovaccin desséché de Paschen, il fallut même faire une réinjection. Le singe 18, qui avait été injecté le 9 février, au moyen de 0 c. c. 5 d'une émulsion au 1/10 de ce dermovaccin desséché, ne présentait pas encore de symptômes le 21 février, et subit une nouvelle injection intracérébrale d'une dose double. Après neuf jours, l'animal mourut d'une encéphalite vaccinale. La première injection n'avait donc, après un délai de douze jours, produit aucune immunité.

Du tableau 1, il résulte que :

1° Après injection intracérébrale de neurolapine, 4 singes moururent respectivement les septième, septième, sixième et huitième jours, donc, en moyenne, sept jours après l'injection; l'hémisphère non injecté donna, dans tous les cas, après inoculation dans la cornée du lapin, des corpuscules de Guarnieri.

2° Après injection intracérébrale de dermovaccin, 4 singes moururent respectivement les neuvième, quatrième, cinquième et huitième jours, donc en moyenne six jours et demi après l'injection. L'hémisphère non injecté donna, dans tous les cas, après inoculation dans la cornée du lapin, des corpuscules de Guarnieri.

3° Après injection intracérébrale de testivaccin, 2 singes succombent respectivement les cinquième et quatrième jours, donc en moyenne quatre jours et demi après l'injection. L'hémisphère non injecté donne dans tous les cas, après inoculation dans la cornée du lapin, des corpuscules de Guarnieri.

La sensibilité du cerveau du *Macacus cynomolgus* à la neurolapine n'apparaît donc pas plus grande qu'à la dermovaccine à la testilapine. Aucune affinité neurotrope particulière ne se manifeste donc. *Le résultat de l'injection intracérébrale ne dépend pas de la nature du virus vaccinal, mais de la quantité et de la virulence du virus.*

TABLEAU I.

NUMÉRO du singe	NUMÉRO du lapin	DATE DE VACCINATION	ENDROIT de vaccination	VACCIN UTILISÉ	RÉSULTAT DE LA VACCINATION
VII	—	19 décembre 1928.	Cerveau.	Neurolapine Gallardo (1). Cerveau de VII.	26 décembre 1928 + 7 jours.
	56 B	26 décembre 1928.	Cornée. • Testicule.		29 décembre 1928, Guarnieri +.
XIII	—	5 janvier 1929.	Cerveau.	Neurolapine Gallardo. Cerveau de XIII. Cerveau de XIII.	12 janvier 1929 + 7 jours.
	94 B 95 B	14 janvier 1929. 14 janvier 1929.	Cerveau. Cornée.		18 janvier 1929 + 4 jours. 17 janvier 1929, Guarnieri +.
XVI	—	22 janvier 1929.	Cerveau.	Neurolapine R1 (2). Cerveau de XVI. Cerveau de XVI. Cerveau de XVI.	28 janvier 1929 + 6 jours.
	47 D 48 D 35 D	29 janvier 1929. 29 janvier 1929. 9 février 1929.	Epiderme. Cornée. Cerveau. Cornée.		Ilémorrh. +. 1 ^{er} février 1929, Guarnieri +. 2 février 1929 + 4 jours. 11 février 1929, Guarnieri +.
XXIV	—	8 avril 1929.	Cerveau.	Neurolapine Gallardo.	16 avril 1929 + 8 jours.
XVIII	—	9 février 1929.	Cerveau.	Dermovaccine desséchée (3). Dermovaccine desséchée. Cerveau de XVIII. Cerveau de XVIII. Testis de 79 D.	—.
	78 D 79 D 94 D	24 février 1929, 2 ^e injection. 2 mars 1929. 4 mars 1929. 11 mars 1929.	Cerveau. Cornée. Testicule. Cornée.		2 mars 1929 + 9 jours. —. 9 mars 1929 +. 12 mars 1929, Guarnieri +.
XIX	—	16 février 1929. 21 février 1929.	Cerveau. Cornée.	Dermovaccine (4). Cerveau de XIX.	20 février 1929 + 4 jours. 23 février 1929, Guarnieri +.
XXI	—	11 mars 1929. 22 mars 1929.	Cerveau. Cornée.	Dermovaccine (5). Cerveau de XXI.	16 mars 1929 + 5 jours. 24 mars 1929, Guarnieri +.

XXIII	— 151 D	8 avril 1929. 13 avril 1929.	Cerveau. Cornée.	Testilapine, 8 ^e passage (7). Cerveau de XXIII.	12 avril 1929 + 4 jours. 15 avril 1929, Guarnieri +.
I	— 85 B 96 B	12 décembre 1928. 22 janvier 1929. 40 janvier 1929. 15 janvier 1929.	Testicule. Cerveau. Cornée.	Dermovaccine (8). Neurolapine Gallardo (9). Testicule de I. Cerveau du lapin 85 B.	++. — 45 janvier 1929 + 5 jours. 17 janvier 1929, Guarnieri +.
IV	— — —	28 novembre 1928. 12 décembre 1928. 22 janvier 1929.	Épiderme. Dans les veines. Cerveau.	Dermovaccine (40). Neurolapine Gallardo. Neurolapine Gallardo (41).	++. —. —.
VIII	— — —	12 décembre 1928. 4 mars 1929. 12 avril 1929.	Épiderme. Épiderme. Cerveau.	Neurolapine. Neurolapine. Neurolapine (42).	++. +. —.
IX	— — —	12 décembre 1928. 4 mars 1929. 18 mars 1929. 10 avril 1929.	Épiderme. Épiderme. Dans les veines. Cerveau.	Dermovaccine (43). Neurolapine Gallardo. Neurolapine Gallardo. Neurolapine Gallardo (44).	++. +. —. —.

(1) 312^e passage.

(2) La neurolapine R 1 est le cerveau du lapin 87 E inoculé dans le cerveau avec le testicule de lapin 69 E, inoculé dans le testicule avec le cerveau d'un enfant mort d'encéphalite postvaccinale.

(3) Vaccino desséchée du professeur Paschen, Hambourg.

(4) Institut Kitasato, virus de cow pox cultivé depuis 1900 exclusivement sur des vaches sans aucun passage de lapin.

(5) Institut Kitasato.

(6) Parc vaccino-gène d'Amsterdam.

(7) Dermovaccine de l'Institut Kitasato qui avait passé six fois dans le testicule de lapin.

(8) Institut Kitasato.

(9) Réfractaire à l'infection intracérébrale.

(10) Institut Kitasato.

(11) Réfractaire à l'infection intracérébrale.

(12) Réfractaire à l'infection intracérébrale.

(13) Institut Kitasato.

(14) Réfractaire à l'infection intracérébrale.

Que les macaques puissent être très fortement immunisés contre le virus vaccinal, c'est ce que prouve le résultat négatif obtenu à la suite d'une forte réinoculation cérébrale au moyen de neurolapine. Le singe n° 4 après injection intratesticulaire de dermovaccin, le n° 4 après cutivaccination avec du dermovaccin et plus tard après injection intraveineuse de neurolapine, le n° 8 après cuti-vaccination avec de la neurolapine et le n° 9 après cutivaccination avec du dermovaccin et plus tard avec de la neurolapine, ce qui donna une faible réaction, supportèrent tous une réinoculation intracérébrale avec de la neurolapine (0 c. c. 5 au 1/10) sans aucune manifestation.

Le tableau II montre qu'il est possible de cultiver en série le virus vaccinal dans le cerveau du *Macacus cynomolgus*. Le délai dans lequel ces singes succombent après injection intracérébrale (cinq, dix, huit, cinq jours) indique que la virulence ne s'affaiblit pas, contrairement à ce qu'on observe avec le virus rabique qui, après passage dans le cerveau du singe, perd rapidement de sa virulence.

Comme Busson et aussi Gildemeister et Karmann ont recherché les rapports immunisants entre le virus vaccinal et le virus rabique, il était intéressant de rechercher comment les singes réfractaires à la réinoculation intracérébrale se comporteraient à l'égard d'une injection intracérébrale de virus fixe. Les singes 1 et 4 reçurent, à cet effet, une injection intracérébrale de virus rabique fixe et moururent le septième et le huitième jour d'une paralysie caractéristique.

Pour finir, quelques remarques relatives à la question de savoir si la réaction hémorragique, qui se produit après la vaccination cutanée avec de la neurolapine, constitue une propriété inhérente à la neurolapine. Cette réaction hémorragique qui donne lieu à de la nécrose, mais dans laquelle le développement de pustules vaccinales est le plus souvent très défectueux et même fait souvent défaut, est, en ce qui regarde ses causes, encore tout à fait obscure. Elle est apparemment propre au virus vaccinal qui n'a pas été cultivé dans le derme, car, après vaccination avec du dermovaccin, quelque virulent qu'il soit, nous n'avons jamais vu apparaître cette réaction hémorragique. Nous avons d'abord pensé à l'influence d'un bacille bipolaire qu'on constate si souvent chez les lapins qui succombent à la

TABLEAU II.

NUMÉRO du singe	NUMÉRO du lapin	DATE DE VACCINATION	ENDROIT de vaccination	VACCIN UTILISÉ	RÉSULTAT DE LA VACCINATION
I	—	12 décembre 1928.	Testicule.	Dermovaccine. Neurolapine Gallardo (4). Testicule de I. Cerveau de 85 B.	+
	85 B	22 janvier 1929.	Cerveau.		—.
	96 B	10 janvier 1929.	Cerveau.		15 janvier 1929 + 5 jours.
II	—	13 janvier 1929.	Cornée.		17 janvier 1929, Guarnieri +.
	55 B	19 décembre 1928.	Cerveau.	Testicule de I.	24 décembre 1928 + 5 jours.
	45 D	24 décembre 1928.	Cornée.	Cerveau de II.	29 décembre 1928, Guarnieri +.
III	—	26 janvier 1929.	Cerveau.	Cerveau de II.	5 février 1929 + 10 jours.
	67 B	24 décembre 1928.	Cerveau.	Cerveau de II.	3 janvier 1929 + 10 jours.
	77 B	3 janvier 1929.	Cornée.	Cerveau de III.	5 janvier 1929, Guarnieri +.
XII	87 B	4 janvier 1929.	Cerveau.	Cerveau de III.	14 janvier 1929 + 7 jours.
	36 D	42 janvier 1929.	Cerveau.	Cerveau de 77 B.	48 janvier 1929 + 6 jours.
	—	11 février 1929.	Cornée.	Cerveau de 87 B.	13 février 1929, Guarnieri +.
XIV	93 B	4 janvier 1929.	Cerveau.	Cerveau de III.	8 décembre 1929 + 8 jours.
	95 B	14 janvier 1929.	Cerveau.	Cerveau de XII.	20 janvier 1929 + 6 jours.
	—	14 janvier 1929.	Cornée.	Cerveau de XII.	17 janvier 1929, Guarnieri +.
XIV	4 D	14 janvier 1929.	Cerveau.	Cerveau de XII.	19 janvier 1929 + 5 jours.
	5 D	19 janvier 1929.	Cerveau.	Cerveau de XIV.	22 janvier 1929 + 3 jours.
	428 D	19 janvier 1929.	Cornée.	Cerveau de XIV.	22 janvier 1929, Guarnieri +.
					Hémorrh. +.
(1) Réfractaire à l'infection intracérébrale.					

suite d'une vaccination avec de la neurolapine (Aldershoff et Pondman, Pette). Mais, comme il n'est pas possible de cultiver le bacille bipolaire dans tous les cas où apparaît la réaction hémorragique après vaccination cutanée avec de la neurolapine chez le lapin, le singe ou l'homme, nous ne lui attribuons ici aucun rôle. Qu'en outre la réaction hémorragique ne soit pas exclusivement caractéristique du virus vaccinal qui a été cultivé dans l'organisme du lapin autrement que sur le derme, c'est ce que montre la réaction hémorragique dans l'épiderme du lapin 149 D (tableau I), qui était inoculé avec le cerveau du singe 22, inoculé lui-même dans le cerveau avec du dermovaccin; un seul passage dans le cerveau d'un singe donnait déjà au dermovaccin le caractère hémorragique.

Le lapin 128 D (tableau II) offre la même preuve, attendu que la vaccination cutanée avec la substance cérébrale du singe 14 (dermovaccin après un passage sur testicules et 4 passages sur cerveau de singes) donnait également une réaction hémorragique.

Nos recherches ont montré que *la réaction hémorragique n'est pas un facteur caractéristique pour la neurolapine*. La testilapine obtenue en inoculant du dermovaccin dans les testicules d'un lapin et qui a ensuite passé six fois dans le testicule, donna, inoculée dans le derme du lapin, une faible réaction hémorragique avec formation de pustules vaccinales. Au neuvième passage, la réaction hémorragique se produisit nettement et le développement de pustules vaccinales fut très défectueux.

Voilà donc que disparaît de nouveau une propriété qu'on croyait caractéristique de la neurolapine. Par contre, l'absence de la réaction hémorragique est probablement une propriété caractéristique du dermovaccin.

CONCLUSIONS.

1° Le cerveau du *Macacus cynomolgus* est sensible à différentes sortes de virus vaccinaux;

2° La neurovaccine ne présente pas d'affinité particulière pour le névraxe du *Macacus cynomolgus*;

3° Il est possible de cultiver le virus vaccinal dans le cerveau du *Macacus cynomolgus* sans que sa virulence diminue;

4° Il est possible de vacciner le *Macacus cynomolgus* si efficacement qu'il supporte sans aucun inconvénient une revaccination intracérébrale;

5° Les macaques réfractaires à une injection intracérébrale de neurolapine succombent, après une réinjection intracérébrale avec du virus fixe, à une paralysie de virus fixe;

6° La réaction hémorragique, qui se produit à la suite de la vaccination cutanée avec de la neurolapine, n'est pas une propriété caractéristique de la neurolapine, mais on la constate aussi après vaccination cutanée avec du virus vaccinal cultivé dans le testicule de lapin ou dans le cerveau du singe. Nous supposons que la réaction hémorragique est une propriété spécifique de tous les virus vaccinaux qui sont cultivés dans les tissus autres que le derme. Sur ce sujet nous poursuivons nos recherches.

BIBLIOGRAPHIE

- LEVADITI et NICOLAU. *Ces Annales*, n° 1, 1923.
 LEVADITI et NICOLAU. *La Presse Médicale*, n° 11, 5 février 1927.
 A. MARIE. *C. R. Soc. de Biol.*, 83, 1920.
 BUSSON, *Wien. Klin. Woch.*, n° 41, 1926.
 GILDEMEISTER et KARMMANN. *Centr. f. Bakt. Abt.*, 1 Orig., 106.
 ALDERSHOFF et PONDMAN. *Centr. f. Bakt. Abt.*, 1 Orig., 107, n° 8.
 PETTE. *Münch. Med. Woch.*, 3 février 1928.

**RECHERCHE ET NUMÉRATION DIRECTE
SUR MILIEU SOLIDE
DU *B. COLI* CONTENU DANS UN GRAND VOLUME D'EAU**

par MM. DIÉNERT et ÉTRILLARD.

La numération du *B. coli* se fait sur bouillon phéniqué en France. Elle présente beaucoup de commodité, elle est rapide, mais elle n'est pas exempte de causes d'erreur. D'une part l'acide phénique a un pouvoir inhibiteur très marqué. Certains germes de *B. coli*, surtout ceux qui ont séjourné un certain temps dans l'eau, y cultivent mal ou pas du tout. C'est pour ce motif que les Américains n'ont pas adopté notre méthode française.

Mais l'acide phénique n'empêche pas la multiplication que du *B. coli*. Beaucoup d'espèces cultivent dans les milieux phéniqués et souvent, surtout aux faibles doses qui sont utilisées dans la recherche du *B. coli* (1 p. 1.000), certaines espèces cultivent mieux et plus vite que le *B. coli*, de telle sorte qu'au bout de quarante-huit heures, le *B. coli* étouffé par cette espèce, ne peut être isolé du liquide de culture. Il est toujours difficile d'annihiler la concurrence vitale et nous avons maintes fois obtenu des résultats négatifs pour le *B. coli* avec des eaux manifestement contaminées.

Nous avons isolé, dans ces eaux, ce germe en utilisant des milieux plus phéniqués que 1 p. 1.000, en particulier dans nos bouillons servant à la recherche de l'Entérocoque et qui renferment 1,8 p. 1.000 d'acide phénique parce qu'avec une plus forte dose de phénol les germes qui empêchaient la culture du *B. coli* ne pouvaient plus pousser et ce dernier microbe reprenait le dessus.

Dans le contrôle de la stérilisation des eaux potables, il y a intérêt à savoir si tous les *B. coli* contenus dans un assez grand volume d'eau sont bien tués et s'ils ne sont pas seulement endormis, leur sommeil momentané pouvant disparaître par la

suite s'ils se trouvent dans de meilleures conditions de culture pour se réveiller. En milieu phéniqué, ces microbes endormis resteront inertes; c'est pourquoi ce milieu n'est pas très recommandable pour ces recherches.

Dans l'étude de l'efficacité d'un procédé de stérilisation, c'est au *B. coli* qu'on s'adresse parce que plus facile à déceler et aussi parce que ses propriétés physiologiques ont quelques similitudes avec celles du bacille d'Eberth, trop difficile à rechercher.

A la suite d'une étude extrêmement approfondie de la stérilisation par le chlore, nous sommes arrivés, après avoir obtenu des résultats déroutants, à cette conclusion qu'il fallait opérer avec un autre milieu que le bouillon phéniqué.

Nous avons étudié beaucoup de milieux et nous nous sommes enfin arrêtés au milieu de Teague, préconisé en Amérique par Max Lévine.

La composition de ce milieu est la suivante :

Eau distillée	4.000 cent. cubes.
Peptone Difco	10 grammes.
Phosphate dipotassique	2 —
Gélose (1).	15 —

L'emploi de la peptone Difco permet d'éviter l'ajustement du milieu au $pH. = 7,5$, mais nous avons utilisé sans inconvénient une peptone d'une autre marque en ayant soin d'ajuster le milieu au $pH. = 7,5$. Au moment de l'usage, pour 100 cent. cubes de cette gélose, on ajoute :

Lactose à 20 p. 100 (en solution stérile) . . .	5 cent. cubes.
Eosine à 2 p. 100.	2 —
Bleu de Méthylène à 0,5 p. 100	2 —

On coule en boîtes Pétri à raison de 25 cent. cubes de gélose par boîte.

RECHERCHE DU *B. COLI* DANS L'EAU. — La recherche du *B. coli* doit se faire dans un volume d'eau d'autant plus grand que le débit de l'eau captée est plus considérable. Les instructions du 12 juillet 1924 préconisent l'utilisation de 100 cent. cubes d'eau pour chaque débit de 50 litres seconde.

(1) On peut aussi faire un milieu avec de la gélatine.

On ne peut ensementer 100 cent. cubes dans un milieu solide, sans en employer une trop grande quantité, ce qui deviendrait très onéreux. D'autre part, l'ensemencement doit se faire à une température inférieure à 35° pour ne pas altérer la vitalité des germes affaiblis, ce qu'on ne pourrait faire avec les milieux gélosés qui fondent à 42°. Enfin, les colonies doivent être superficielles, bien étalées et bien isolées.

Nous avons adopté la technique suivante qui peut être utilisée dans bien d'autres circonstances où l'isolement des germes en surface est recommandé.

On concentre les germes de l'eau à l'aide d'un coagulant qui est de l'alumine neutre avec 70 p. 100 d'eau préparée par voie humide et stérile contenue dans une fiole et qu'on introduira dans l'eau à raison de 20 cent. cubes de cette suspension d'alumine pour 1.000 cent. cubes d'eau. On agite énergiquement l'eau additionnée d'alumine et on laisse déposer dans un endroit frais pendant deux heures. Ceci fait, on soutire avec un siphon stérile le liquide surnageant le précipité et on centrifuge ce dernier à la centrifugeuse à eau. On a ainsi dans un tube un culot d'alumine contenant 90 à 95 p. 100 des germes de *B. coli* contenus dans 1.000 cent. cubes qu'on sépare de l'eau surnageante. Ce culot d'alumine est alors mélangé, à la température de 30°, avec 20 cent. cubes d'un mélange de 1/3 de gélose de Teague et de 2/3 de gélatine de Teague. On agite bien le tout et on répand ce mélange sur les plaques de Pétri contenant déjà 25 cent. cubes de gélose de Teague stérile et solidifiée, à raison de 2 cent. cubes par plaque.

L'avantage de cette pratique est d'obtenir un ensemencement à faible température (30°) des germes contenus dans l'alumine et un étalement sur gélose d'une faible quantité du milieu ensemencé, par conséquent des colonies très superficielles. On place à la température de 37°; ce milieu, ainsi ensemencé, peut, sans fondre, être placé à la température supérieure à celle de son ensemencement. Au bout de vingt-quatre ou même quarante-huit heures, on observe les plaques de Pétri.

ASPECT ET CARACTÈRES DES COLONIES DE *B. COLI* SUR CE MILIEU. — Sur cette gélose, le *B. coli* donne des colonies de 2 à 3 millimètres de diamètre qui, vues par transparence, ont un centre

bleu sombre, presque noir, couvrant plus des $3/4$ de la colonie. La structure interne de la portion centrale est difficile à discerner. Par réflexion, on observe, au centre, une sorte de bouton surélevé bleu noirâtre, entouré d'une rigole circulaire. La partie périphérique de la colonie prend l'aspect gris métallique.

Signalons incidemment que sur ce même milieu les colonies appartenant au groupe du *Lactis aerogenes* sont plus larges que celles du *B. coli* (4 à 6 millimètres diamètre). Leur centre brun foncé, vu par transparence, est moins noir que pour *B. coli*. Par réflexion, elles paraissent plus claires que celles du *B. coli* et l'on n'observe pas l'aspect métallique.

Après vingt-quatre heures d'incubation à 37° , on notera et comptera les colonies présentant avec netteté les caractères que nous venons d'indiquer et l'on répétera ce comptage après quarante-huit heures. Si l'on a des doutes, on prélèvera quelques colonies aux fins d'identification.

Par cette méthode, dans 5 cent. cubes d'eau de Seine brute nous avons compté et identifié 15 colonies de *B. coli*, tandis que le même volume d'eauensemencé sur bouillon de levure phéniqué à 1 p. 1.000 a accusé la présence de 2 *B. coli* seulement.

RECHERCHE DU BACILLE D'EBERTH. — La même méthode peut être utilisée pour la recherche du bacille d'Eberth. Ce germe, en surface, donne sur ce milieu de petites colonies d'un rouge vif, de la grosseur d'une tête d'épingle et qui tranchent nettement sur ce milieu qui est, suivant les espèces qui se multiplient, violet ou gris bleu. Les colonies de *B. d'Eberth* sont même plus faciles à distinguer que celles de *B. coli*. Toutefois ces colonies rouges ne sont pas la majorité. Elles paraissent être les représentants de la forme S du *B. d'Eberth* des Américains. La forme R donne des colonies étalées, bleu clair, faciles à différencier de celles du *B. coli*.

FLOCCULATION DES SÉRUMS EN PRÉSENCE DE MÉLANGES ANTIGÈNES-TEINTURES DE RÉSINES

par R. DUJARRIC DE LA RIVIÈRE, ÉTIENNE ROUX, N. KOSSOVITCH.

Jean Perrin termine son livre *Les Atomes* en disant que « les atomes ne sont pas ces éléments éternels et insécables dont l'irréductible simplicité donnait au Possible une borne, et, dans leur inimaginable petitesse, nous commençons à pressentir le fourmillement prodigieux de Mondes où règne un ordre étrangement nouveau ». C'est la Chimie-physique, au développement de laquelle les travaux de Jean Perrin ont tant contribué, qui peu à peu nous dévoile ces mondes nouveaux. On sait, en effet, combien elle a, durant ces dernières années, étendu son domaine et quel appui elle a déjà prêté à diverses sciences. La Bactériologie et la Sérologie ont pu, à leur tour, profiter des données nouvelles apportées par la Chimie physique.

Parmi les travaux qui tendent à prouver l'heureuse influence que la Chimie-physique peut avoir sur la technique sérologique, ceux qui ont trait à l'étude du rythme de floculation des sérums dans des conditions déterminées nous ont paru particulièrement intéressants. Nos recherches ont porté sur la floculation qui se produit lorsqu'on met certains sérums en présence d'un mélange de l'antigène qui leur correspond et d'une teinture de résine. Nous avons pris comme exemple les sérums syphilitiques et les sérums dits « antimicrobiens » (particulièrement les sérums antiméningococciques), et étudié l'action d'un certain nombre de résines (benjoin, gomme-gutte, etc.). Nous nous sommes efforcés d'élucider le mécanisme de cette floculation ou tout au moins de déterminer l'action qu'ont sur elle certains agents physiques ou chimiques.

PREMIÈRE PARTIE

LA RÉACTION DE FLOCCULATION.

I. — Sérums syphilitiques.

Les travaux que Levaditi, Marie, Yamanouchi publièrent en 1907 ont modifié complètement notre conception du mécanisme intime de la séro-réaction de la syphilis par la méthode de Bordet-Wassermann. Ils établissaient que la valeur de l'antigène n'est pas en rapport avec la présence ou l'absence de Tréponèmes dans le foie utilisé pour sa préparation, à telle enseigne qu'on pouvait, sans changer le résultat, remplacer dans la réaction l'extrait de foie syphilitique par de l'extrait de foie normal.

Dès lors, il devenait bien évident que la réaction de Bordet-Wassermann ne pouvait plus s'expliquer par une réaction spécifique des antigènes et des anticorps, contrairement à ce qu'on avait admis jusqu'alors. Et les auteurs attribuaient la réaction « à la présence dans le sérum et dans le liquide céphalo-rachidien de certains composés à l'état colloïdal qui, en présence des sels biliaires et des lipoïdes du foie (employé comme antigène), précipitent et déterminent la fixation du complément ». Idée féconde, car elle devait engager les chercheurs à étudier plus complètement les propriétés physico-chimiques des sérums syphilitiques et conduire à la découverte de méthodes simples mettant en évidence ces propriétés.

Les travaux de Levaditi et de ses collaborateurs furent, en effet, confirmés et complétés par les recherches de nombreux expérimentateurs. C'est ainsi que Porgès, Neubauer, Élias, Salmon mettent en évidence cette précipitation en substituant aux extraits d'organes une émulsion de lécithine. Le phénomène devient plus apparent et plus régulier si on emploie des émulsions dans l'eau physiologique d'extraits alcooliques d'organes additionnés de cholestérine, comme l'ont démontré Sachs et Georgi. On voit alors apparaître dans les sérums syphilitiques des granules, des petits flocons, dont la présence trouble le liquide plus ou moins suivant leur grosseur et leur

abondance. On dit que le sérum « floccule » et le phénomène a reçu le nom de « flocculation ».

Ainsi, il était bien établi qu'il se produit, au cours de la syphilis, une modification de l'état physico-chimique du sérum sanguin (et du liquide céphalo-rachidien) des malades. Cette modification peut être mise en évidence, car elle se traduit en particulier par le fait qu'un sérum syphilitique floccule avec facilité, et suivant un rythme spécial, lorsqu'il est mis en présence de certaines suspensions colloïdales.

Plusieurs réactions ont été imaginées pour établir pratiquement une méthode de diagnostic de la syphilis basée sur ces constatations expérimentales. Mais, proposées depuis 1908, elles ont été peu employées, la réaction de Bordet-Wassermann restant plus en faveur. Pendant la guerre de 1914, le grand nombre de sérums syphilitiques à examiner, la pénurie d'animaux, la difficulté de conserver les hématies, le manque de matériel, ont obligé les travailleurs à chercher des techniques sérologiques simples. On a repris alors les méthodes de flocculation, on les a essayées sur une grande échelle : on a ainsi constaté leur valeur et on les a conservées en les perfectionnant.

Parmi ces méthodes de flocculation, certaines ne demandent que des moyens optiques rudimentaires (lecture à la loupe avec ou sans éclairage spécial), mais donnent des résultats d'une lecture ou d'une interprétation souvent fort difficile ; d'autres apportent des résultats précis, mais nécessitent une instrumentation délicate et coûteuse. Nous avons étudié une méthode qui donne par la flocculation des résultats nets, faciles à interpréter, et cela sans aucune instrumentation optique spéciale. Elle consiste essentiellement à introduire le sérum dans un mélange d'antigène syphilitique et de teinture de benjoin, suivant la technique que nous allons indiquer et dont nous avons tout d'abord poursuivi l'étude avec L. Gallerand.

(1) Voir *C. R. de la Société de Biologie*, 1923 à 1927.

Technique.

A. — PRÉPARATION DES RÉACTIFS.

1° *Antigène syphilitique.* — Voici tout d'abord la formule de l'antigène Bordet-Ruelens :

On hache 100 grammes de cœur frais de veau (il n'est pas nécessaire de hacher finement); *on ne prend que du muscle*, on enlève soigneusement les vaisseaux, les fibres, la graisse; on le met dans un flacon avec 125 cent. cubes d'alcool à 75°. On laisse en contact pendant quelques heures à la température du laboratoire, en ayant soin d'agiter. Ce premier temps a pour but de produire la coagulation des albuminoïdes.

Au bout de vingt-quatre heures, on filtre (sur double de papier Laurent); le filtrat est jeté; le tissu qui reste est séché pendant vingt-quatre heures, à l'étuve à 37° (pour cette dessiccation il suffit de l'étaler, par exemple, sur le couvercle d'une boîte de Pétri).

Le tissu sec est mis dans un flacon avec 200 cent. cubes d'acétone. On laisse en contact pendant dix ou douze jours *en agitant de temps en temps*. On peut aussi pulvériser plus finement ce tissu et l'épuiser dans un appareil de Soxhlet pendant vingt-quatre à trente heures.

Au bout de ce temps, on filtre (sur double de papier Laurent); le filtrat est jeté. Les lipoïdes que l'acétone avait dissous et qui disparaissent ainsi nuiraient à la réaction; les lipoïdes précipités et qui seront solubilisés par l'alcool, sont les seuls utilisés. On sèche le tissu pendant vingt-quatre heures.

Le tissu sec est mis en contact avec 200 cent. cubes d'alcool à 95° pendant dix jours (*bien agiter le mélange tous les jours*). Une filtration sur papier donne alors l'antigène brut, liquide jaune d'or, parfaitement limpide à la température du laboratoire. Desséché à 37° dans un verre de montre pendant vingt-quatre heures, il laisse 8 à 10 milligrammes de résidu par centimètre cube. Maintenu en flacon brun à la température du laboratoire, il se conserve pendant plusieurs mois.

Cet antigène a pour lui le mérite de sa facilité de prépara-

tion, mais, comme nous le dirons plus loin, *on peut employer, pour notre réaction, tous les autres antigènes alcooliques* : antigène foie d'hérédé, antigène cœur humain, antigène cœur de cheval, péréthynol de Vernes.

2° *Teinture de benjoin*. — 1 gramme de résine de benjoin de Sumatra finement pulvérisée est mis en contact avec 10 cent. cubes d'alcool *absolu*; on laisse macérer pendant quarante-huit heures en agitant fréquemment; on filtre sur papier (filtrer et non décanté) pour avoir une liqueur absolument limpide.

B. — PRÉPARATION DES SÉRUMS.

Il faut autant que possible utiliser *des sérums frais, c'est-à-dire récemment sortis de l'organisme*. La réaction est si simple et demande si peu de matériel qu'on peut la pratiquer peu de temps après la prise de sang, sans attendre d'avoir groupé un certain nombre de sérums comme on le fait pour la réaction de Wassermann.

Les sérums doivent être clairs (les centrifuger au besoin). Il est nécessaire de les inactiver par chauffage au bain-marie à 56° pendant trente minutes. Les expériences de Sahlmann (1) ont établi que certains composés labiles des albumines du sérum peuvent empêcher la floculation. Le chauffage, en stabilisant, fait disparaître ce phénomène.

Enfin il est indispensable, comme nous le montrerons plus loin, d'utiliser les sérums aussitôt après leur chauffage au bain-marie.

C. — TECHNIQUE DE LA RÉACTION.

Elle est extrêmement simple :

1° *Préparation du mélange initial*. — Dans un tube à essai parfaitement propre et sec on mélange en proportions convenables l'antigène alcoolique et la teinture de benjoin (par exemple 1 de benjoin et 5 d'antigène). On agite; le mélange est très homogène. Appelons-le *mélange initial*.

2° *Réaction*. — Dans un gros tube à hémolyse (de 20 milli-

(1) SAHLMANN, Ueber das Verhalten der Albumine und globuline beim serologischen Luesnachweis. *Zeit. für Immun.*, 33, 1921, p. 130.

mètres environ) *parfaitement propre*, on verse 5 cent. cubes d'eau physiologique à 8,5 p. 100. Il est bon de mettre préalable-

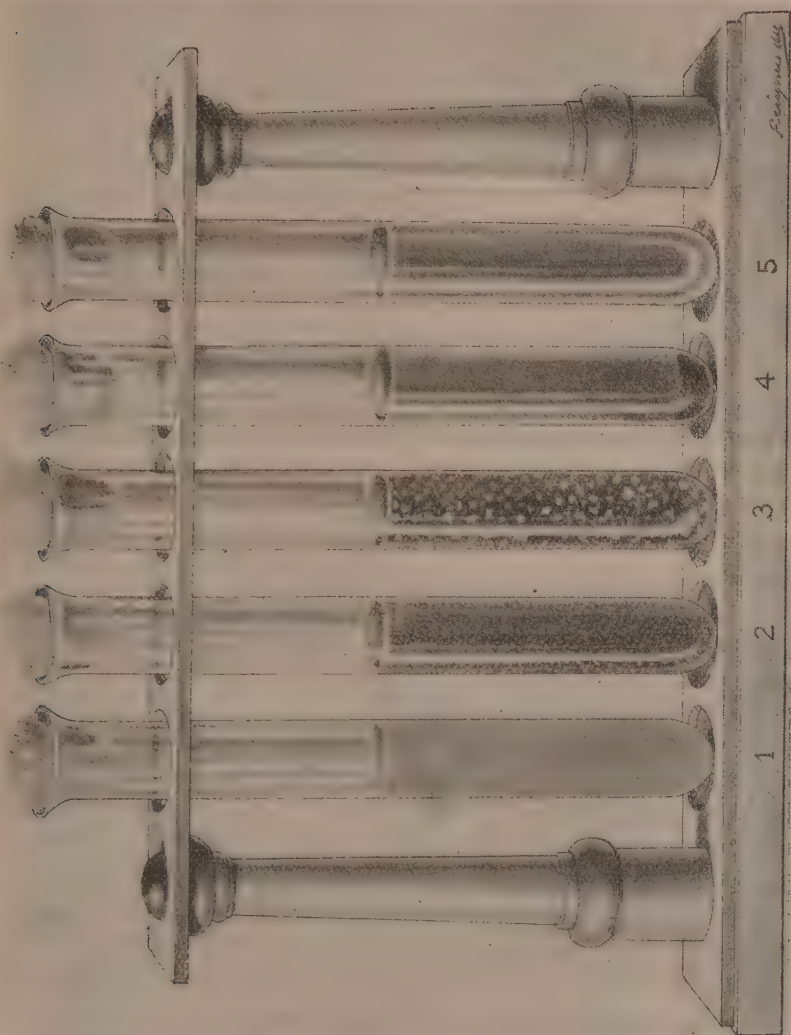


Fig. 4. — Dispositif de la réaction de flocculation.

4, Emulsion sans sérum; — 2, Positif +; — 3, Positif +; — 4, Positif total Ft; — 5, Négatif.

ment cette eau physiologique à l'étuve (ou au bain-marie) afin que sa température soit au voisinage de 37°. De même pour l'eau qui servira à rincer les pipettes; la verrerie elle-même doit être mise préalablement à l'étuve à 37°. *Puis* (et non avant)

on verse 1/10 de centimètre cube du mélange initial; on agite; la suspension doit être homogène. Il faut préparer l'émulsion dans l'eau physiologique immédiatement avant l'usage.

A ce mélange homogène on ajoute alors 1 cent. cube de sérum chauffé qu'on introduit aussitôt après sa sortie du bain-marie. On mélange soigneusement (par agitation et sans retourner le tube). On met à l'étuve à 37°.

TABLEAU I. — Dispositif de la réaction.

	EAU physiologique à 8,5 p. 100	MÉ- LANGE initial	SÉRUM	
Sérum positif .	5 c. c.	0 c. c. 1	1 c. c.	Floculation (F + F ++ et FT avec clarification du liquide surnageant)).
Sérum négatif .	5 c. c.	0 c. c. 1	1 c. c.	L'émulsion reste homogène.
Témoin	5 c. c.	0 c. c. 1		L'émulsion reste homogène.

D. — LECTURE DES RÉSULTATS.

La lecture est nette, sans possibilité de fausses interprétations : la floculation est très apparente, *visible facilement sans l'aide d'aucun appareil d'optique*. On distingue aisément trois stades successifs : floculation à grains fins (F +), floculation à gros grains (F ++) et floculation totale avec dépôt des flocculats au fond du tube et liquide clair surnageant (F T). Il suffit d'avoir vu une fois ces divers états physiques pour les reconnaître ensuite très facilement. Nous les distinguons parce que, s'il est vrai que les sérums fortement positifs (syphilitiques récents, jamais traités) passent successivement par ces trois stades, et si, de ce fait, on n'a à retenir que le dernier, d'autres sérums (syphilitiques anciens ou traités) s'arrêtent à l'un des premiers stades, et on peut ainsi établir une classification.

Nous considérons comme positif tout sérum qui donne une floculation, au moins à petits grains, car jamais nous n'avons vu le sérum d'un individu normal flocculer en présence de notre mélange, même après vingt-quatre ou quarante-huit heures d'étuve.

Le temps de floculation varie avec les sérums syphilitiques et

s'étage depuis une heure jusqu'à vingt-quatre heures, et on ne saurait trop souligner l'importance de cette constatation, car la rapidité, autant que l'intensité de la floculation, paraît être en rapport avec l'infection syphilitique. C'est un fait que nous avons vérifié sur une grande quantité de sérums. Les sérums des syphilis récentes ou non traitées flocculent fortement et rapidement (de une heure à cinq heures); ceux des syphilis anciennes ou mal traitées flocculent lentement (douze à vingt-quatre heures); il y a de nombreux chiffres intermédiaires.

E. — REMARQUES.

1° a) Il faut employer du *benjoin de Sumatra* et une bonne origine de cette résine (certaines falsifications peuvent la rendre impropre à la floculation). Le meilleur moyen de s'assurer qu'on possède une bonne origine de benjoin est d'éprouver celui-ci en présence d'un sérum sûrement syphilitique.

b) Dès nos premiers essais, la proportion à établir entre la quantité de benjoin et la quantité d'antigène de Bordet-Ruelens a spécialement retenu notre attention. S'il y a trop de benjoin, l'émulsion floccule d'elle-même; s'il n'y en a pas assez, la réaction perd de sa netteté.

Nos essais ont donné les résultats suivants : 1° les mélanges 4/1, 4/2, 4/3, 4/4 (4 étant le benjoin et 1, 2, 3, 4, l'antigène) flocculent dès qu'ils sont mis en présence de l'eau physiologique ou de l'eau distillée; 2° les mélanges 4/5, 4/6, 4/7, 4/8, 4/9, 4/10 ne flocculent pas d'eux-mêmes, mais à partir de 4/9 les flocculats sont plus fins et la réaction est moins apparente. Dans la plupart des cas, 4/5 est le premier qui ne floccule pas; nous le considérons comme le *seuil* de floculation, mais il est fort près de la limite, et nous utilisons pour la réaction le taux de 4/6; ce taux s'est montré valable pour la plupart des origines d'antigène syphilitique ou de teinture de benjoin. On doit cependant, quand on prépare de nouveaux réactifs, chercher pour chaque mélange initial le *seuil de floculation* et prendre pour la réaction définitive le chiffre immédiatement supérieur à celui qui marque ce seuil.

c) Il faut éprouver le mélange initial en présence de sérums syphilitiques connus, de même qu'il faut éprouver tout nouvel

antigène avant de pratiquer avec lui la réaction de Wassermann. Il est nécessaire aussi de répéter cette vérification tous les deux mois par exemple, car les antigènes peuvent baisser. Ce sont là des faits bien connus de tous ceux qui s'occupent de sérologie.

d) Il faut faire un témoin en mettant en présence de l'émulsion un sérum normal. Ce sérum peut être *quelconque*, pourvu qu'il ne soit pas syphilitique (sérum humain, sérum normal de

TABLEAU II. — Influence de la température du mélange sur les résultats de la réaction.

Antigène (1/6)	0 c. c. 1	0 c. c. 1	0 c. c. 1	0 c. c. 1	0 c. c. 1
Sérum	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.	1 c. c.
Intervalle entre la sortie du sérum du bain marie et la réaction	0'-2'	5'	10'	15'	20'
NUMÉRO DU SÉRUM	RÉSULTATS				
1	++++	++++	+++	++	+
2	++++	++++	+++	++	+
3	+++	+++	+++	+	+
4	++++	+++	+++	+	+
5	++++	++++	+++	+	+
6	++++	+++	+++	+	+
7	+++	++	++	+	+
8	+++	+++	+	+	+
9	++++	++++	+++	+	+
10	++++	+++	+	+	+

cheval). Car un fait nous a paru très digne d'attention et de nature à rassurer sur la possibilité de fausses floculations avec notre technique : lorsqu'on ajoute un sérum négatif aux mélanges qui floculent spontanément, on voit, après mise à l'étuve et temps variable suivant la dose, le mélange redevenir homogène à la condition qu'on ne soit pas trop près d'une forte dose de benjoin; par exemple le phénomène se produit avec 1/4 et 1/3, quelquefois avec 1/2, jamais jusqu'ici avec 1/1. Ce phénomène est net et constant.

2° Nous insistons tout spécialement sur le fait qu'il faut, pour la réaction, utiliser les sérums immédiatement après leur chauffage à 56°, dès qu'il sont retirés du bain-marie. La preuve en est donnée par l'expérience résumée par le tableau II (1).

(1) Voir N. KOSSOVITCH. Réaction de la floculation des sérums syphilitiques par la méthodes des mélanges antigènes-résines « Réaction F. D. » *Thèse de Paris*, 1928, Éditions médicales Édit.

On voit que les meilleurs résultats sont obtenus en ajoutant les sérums immédiatement après leur sortie du bain-marie. Les résultats ont été lus après le même temps de séjour à l'étuve.

C'est là un point délicat de la réaction. Il faut agir vite et pour cela avoir préparé d'avance réactifs et matériel.

*
* *

Nous avons cherché à obtenir avec un même sérum et un même antigène, mais avec deux résines, les phénomènes d'*opacification* et de *floculation*. Pour l'opacification nous nous sommes adressés à la gomme-gutte. Nous avons, dans ce but, repris avec des sérums syphilitiques, les expériences que nous avons fait rétablir (1) sur les sérums méningococciques : si on ajoute à l'émulsion dans l'eau physiologique d'un mélange d'antigène méningo et de teinture de gomme-gutte un sérum méningo, *l'opacité augmente*; dans les mêmes conditions, le mélange *s'éclaircit complètement* si on a employé un sérum normal. Nous avons constaté que cette réaction est applicable aux sérums syphilitiques à la condition, bien entendu, de remplacer l'antigène méningo par de l'antigène syphilitique.

L'expérience est disposée de la façon suivante :

1° On fait un mélange au 1/6 de teinture (au 1/10 dans l'alcool absolu) de gomme-gutte et d'antigène syphilitique. C'est le *mélange initial*.

2° Dans deux grands tubes contenant chacun 5 cent. cubes d'eau physiologique on ajoute, pour chacun, 1/10 de centimètre cube de ce mélange initial. On obtient deux émulsions opalescentes.

3° A l'une de ces émulsions, on ajoute 1 cent. cube de sérum syphilitique, à l'autre 1 cent. cube de sérum normal. Les sérums ne sont pas chauffés et la réaction se fait à la température du laboratoire. Avec le sérum syphilitique l'opacité se maintient ou augmente, avec le sérum normal l'émulsion devient complètement claire.

Il ne faut pas tenir compte (au point de vue opacification) des modifications qui se passent après trente minutes, la réaction étant *instantanée* (quelques minutes au plus); si on conserve le

(1) C. R. Soc. de Biol., 30 janvier 1926.

tube, on constatera souvent le lendemain une floculation dans les tubes où on a mis du sérum syphilitique. Mais au point de vue floculation, les résultats sont moins rapides et moins nets que ceux que donne le benjoin.

Lorsqu'on dispose d'un bon échantillon de gomme-gutte, cette réaction est très nette. Il n'en est malheureusement pas toujours ainsi. Du reste l'opacification, intéressante au point de vue théorique, est, au point de vue pratique, moins importante que la floculation. La première méthode, en effet, ne répond que par oui ou par non, tandis que la seconde apporte deux renseignements : la *rapidité* et l'*intensité* de la floculation, facteurs que nous avons toujours vu varier très nettement, comme nous l'avons dit plus haut, suivant les sérums (syphilis au début, syphilis ancienne, traitée ou non) et qui peuvent donner au thérapeute des indications précieuses.

Si bien qu'après un certain nombre d'essais, et tout en signalant la possibilité de pratiquer avec la gomme-gutte une réaction d'opacification en même temps que la réaction de floculation au benjoin, nous avons conservé cette dernière réaction comme méthode de fond et c'est à elle que se rapportent les résultats que nous allons indiquer.

RÉSULTATS.

Nous avons examiné, à l'heure actuelle, près de 3.000 sérums qui nous permettent d'affirmer la spécificité de la méthode.

Dans tous les cas où cliniquement il n'existait ni signes, ni stigmates de syphilis (tuberculose, mycoses, cancer, troubles digestifs, gonococcies, affections diverses, syphiliphobes), la réaction de floculation a été négative.

Dans tous les cas où il existait cliniquement des signes certains de syphilis chez des malades non traités (chancres dont plusieurs amygdaliens en voie de disparition, roséoles, aortites, syphilis nerveuses, syphilis tertiaires *jamais traitées*), la réaction de floculation a été positive.

Lorsque le traitement a été peu intensif ou de courte durée, les résultats ont varié suivant les cas, mais ordinairement notre réaction s'est montrée un peu plus sensible que la réaction de Wassermann.

TABLEAU III.

	NOMBRE des cas	BW		FD	
		Positif	Négatif	Positif	Négatif
Syphilis primaire { début	6		6	4	2
{ après chancre	39	22	17	22	17
Syphilis secondaire	81	62	19	60	21
Syphilis tertiaire	109	28	81	28	81
Syphilis latente	99	13	86	19	80
Hérédo-syphilis	7	2	5	4	3
Témoins :					
Affections diverses non suspectes de syphilis	66		66		66
Totaux	407	127	280	137	270
Sur 407 cas examinés :					
Positifs { BW 31,2 p. 100					
{ FD 33,7 p. 100					

	NOMBRE DES CAS	RÉACTIONS BW et FD concordantes		RÉACTIONS BW et FD discordantes		CONCOR- DANCE des deux réactions en p 100
		BW + FD	BW - FD -	BW + FD -	BW - FD +	
Syphilis primaire { début	6		2		4	33,3
{ après chancre	39	22	17			100
Syphilis secondaire	81	60	19	2		97,5
Syphilis tertiaire	109	28	81			100
Syphilis latente	99	13	80		6	94
Hérédo-syphilis	7	2	3		2	71,4
Témoins :						
Affections diverses non suspectes de syphilis	66		66			100
Totaux	407	125	268	2	12	
Concordantes : 393				96,6 p. 100		
Discordantes : 14				3,4 —		
Concordantes positives				30,7 —		
Concordantes négatives				65,8 —		

BW, veut dire réaction de Bordet-Wassermann; FD, flocculation au mélange antigène-benjoin.

Le tableau III donne le détail de 407 cas qui sont rapportés dans la thèse de N. Kossovitch (1) et où chaque malade a été

(1) *Loc. cit.*

suiivi cliniquement et sérologiquement pendant longtemps.
Le graphique figure 2 schématise les données du tableau III.

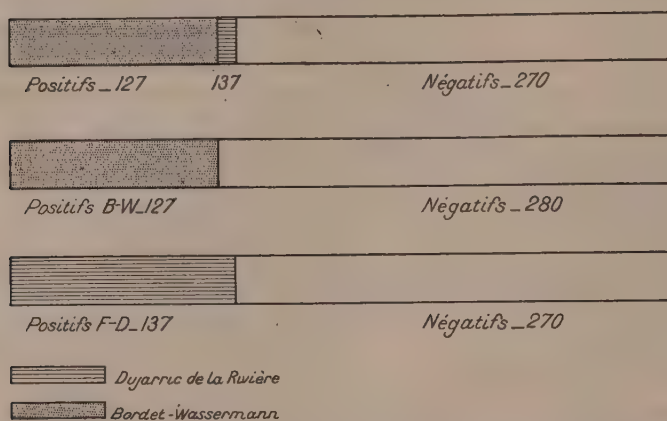


FIG. 2. — Proportion des cas positifs avec les méthodes de Bordet-Wassermann et Dujarric de la Rivière (*Thèse de N. Kossovitch*).

Comme on le voit, la réaction de floculation que nous venons de décrire est à la fois plus précoce et plus sensible que la réaction de Bordet-Wassermann. Remarquons que même à sensi-

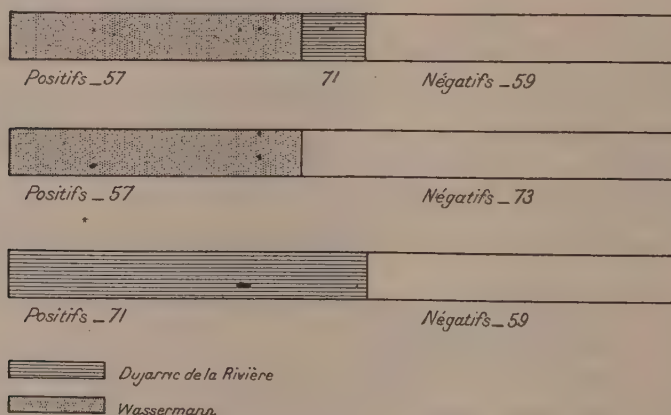


FIG. 3. — Proportion des cas positifs et négatifs avec les méthodes de Bordet-Wassermann et de Dujarric de la Rivière (*Thèse de F.-M. Filho*).

bilité égale, la réaction de floculation aurait encore, sur la réaction de Bordet-Wassermann, l'avantage d'une beaucoup plus grande simplicité de technique.

Uréchia et Ciocan (*Soc. de Biol. Section roumaine*, 27 mars 1926), rapportant les résultats de 536 cas étudiés sérologiquement et cliniquement, concluent que notre réaction « est un réactif très sensible, plus sensible que la réaction de Bordet-Wassermann ». C'est aussi l'avis de M. le Dr F. M. Filho qui, dans les conclusions de sa thèse inaugurale (1), apporte les résultats suivants (que nous citons dans leur texte même) :

Total des malades examinés : 130

(examen clinique complet, réaction de Wassermann, réaction de flocculation).

Réactions négatives concordantes	59
Réactions positives concordantes.	57
Réactions positives au Wassermann	57
Réactions positives au Dujarric	71
Réactions positives au Dujarric et négatives au Wassermann.	14
Réactions positives au Wassermann et négatives au Dujarric.	0

Soit :

Pourcentage de Wassermann positifs	43,8
Pourcentage de Dujarric positifs.	54,6

V. Georgesco (*Soc. roumaine de Biol.*, 25 novembre 1925) a étudié par notre procédé de flocculation 295 sérums syphilitiques et, à titre de contrôle, un nombre égal de sérums normaux. La concordance avec les examens cliniques (et le cas échéant avec d'autres réactions sérologiques) a été de 100 p. 100.

D'autres auteurs ont également adopté notre méthode de flocculation : Sachs et Klopstock (10 *Tagung Deutsch Verein f. Mikrob. in Centr. f. Bakt* 1924, p. 167), Starobinsky (*Presse Méd.*, 14 mars 1925), Ströszner (*C. B. Bakt*, 1925, p. 23), Badoux (*An. Maladies vénériennes*, n° 1, janvier 1926). Nous nous permettrons de faire remarquer — certains auteurs qui ont employé notre méthode ayant omis de nous citer — que les travaux que nous avons poursuivis constamment sur cette question avec divers collaborateurs depuis 1923, ont une priorité de plus de deux ans sur ceux qui les ont suivis.

(1) Dr FLAVIO MARÓJA FILHO. Da sóro-diagnose da syphilis pela reacção de Dujarric (Trabalho de Clinica dermato-syphilographica de Policlínica geral). Thèse de Doctorat de la Faculté de Rio de Janeiro, 1927, Rodrigues et Cie, Ed. Rio.

II. — Sérums antiméningococciques.

C'est en essayant de trouver un procédé de titrage des sérums antiméningococciques que nous avons été amené à étudier le pouvoir floculant de ces sérums.

L'agglutination et la déviation du complément sont actuellement les deux méthodes les plus employées pour le titrage des sérums antiméningococciques. A la vérité on les emploie faute de mieux, car on chercherait vainement dans la littérature scientifique des faits qui, par exemple, établiraient d'une façon précise, pour un même sérum, une concordance entre la valeur thérapeutique et le taux d'agglutination ou de déviation du complément. C'est également la conclusion de l'étude expérimentale et clinique que nous avons faite, durant ces dernières années, de nombreuses origines de sérums antiméningococciques.

Si l'on s'en tient malgré tout à ces méthodes, c'est parce que l'inoculation à l'animal — si précieuse pour le dosage des toxines ou pour celui des sérums anti-toxiques — n'est ici d'aucun secours. Persuadés qu'on ne posséderait une méthode précise de dosage que le jour où l'on pourrait déterminer la dose minima mortelle de méningocoques capable de tuer l'animal dans un délai constant et la dose de sérum nécessaire pour la combattre, nous avons pratiqué de nombreuses inoculations aux animaux de laboratoire (Cobaye, Rats, Souris, Lapins, Oiseaux). Nous avons multiplié les conditions de l'expérience : culture des souches de méningocoques sur les milieux les plus divers — présentations variables du produit injecté : cultures émulsionnées, filtrat de cultures, toxines préparées suivant les procédés de Kraus et Doerr, de Gordon — voies d'inoculation diverses (peau, péritoine, veine).

Sans doute, beaucoup d'animaux inoculés succombent; il est facile d'imaginer, par comparaison avec celles employées pour d'autres sérums, des méthodes de dosage, — et nous les avons plusieurs fois réalisées — qui détermineraient par exemple jusqu'à quel taux de dilution un sérum à l'étude empêche la mort de l'animal. Mais avec le méningocoque une pareille

méthode de dosage n'aurait qu'une valeur apparente. En réalité, si on inocule beaucoup d'animaux, si on les suit pendant longtemps, on est bien obligé de reconnaître que leur sensibilité à l'infection méningococcique est très variable. Si on inocule des cobayes avec une même origine de méningocoque — ceux qui ont reçu du sérum ayant résisté à l'injection, — il existe toujours parmi les témoins un nombre important d'individus qui résistent sans avoir reçu de sérum ; pour une même origine microbienne, le temps au bout duquel les animaux succombent est très différent suivant les sujets. Il y a encore d'autres variantes et on peut affirmer qu'actuellement aucune méthode d'inoculation à l'animal ne donne de résultats *suffisamment constants* pour permettre de baser sur elle un procédé précis de dosage.

Le mieux serait évidemment de reconnaître que nous ne disposons encore d'aucun procédé valable de dosage des sérums antiméningococciques. Mais, à l'étranger, on continue à exiger, pour admettre ces sérums, qu'ils possèdent un taux déterminé d'agglutination ou de déviation du complément. Or, pour les nombreuses déviations du complément que nous avons à pratiquer, nous étions arrivés à substituer à l'émulsion de corps microbiens ordinairement employée (et qu'il faut chaque fois préparer) un antigène alcoolique (pouvant servir très longtemps) obtenu par macération de corps microbiens dans l'alcool suivant une technique que nous indiquerons plus loin.

Lorsque, par la suite, nous avons constaté, en étudiant une réaction de flocculation pour le diagnostic de la syphilis que l'addition à l'antigène alcoolique de Bordet et Ruelens d'une quantité déterminée de teinture de benjoin permettait d'obtenir, avec les sérums syphilitiques, une flocculation facile à réaliser et à interpréter, se produisant suivant un rythme régulier, nous avons entrepris des recherches pour savoir s'il serait possible d'établir une méthode comparable pour les sérums méningococciques.

Technique.

A. — PRÉPARATION DES RÉACTIFS

1° *Extraits alcooliques de méningocoques.*

Pour préparer cet extrait alcoolique, on émulsionne, dans 100 cent. cubes d'alcool *absolu*, les colonies de méningocoques qui ont poussé sur 5 boîtes de Roux. Il s'agit ici d'une culture de vingt-quatre heures sur gélose ordinaire à 3 p. 100; les germes que nous conservons au laboratoire étant habitués à pousser sur cette gélose, les cultures sont abondantes. *Après avoir soigneusement enlevé l'eau de condensation*, on verse dans chaque boîte 20 cent. cubes d'alcool; avec une pipette ou un fil métallique, recourbés à leur extrémité et stérilisés, on racle doucement la culture en ayant soin de ne pas entamer la gélose (c'est à dessein que nous employons une gélose à 3 p. 100 plus résistante que la gélose ordinaire à 2 p. 100).

On réunit dans un flacon très propre, préalablement rincé à l'alcool et contenant des perles de verre stérilisées, le liquide d'émulsion des cinq boîtes. On laisse au contact, à l'obscurité pendant au moins un mois (1); on agite fréquemment. Au bout de ce temps on filtre sur papier: le filtrat parfaitement clair, constitue l'antigène méningococcique. Il conserve longtemps ses propriétés; nous utilisons encore certains antigènes qui datent de plusieurs années. Nous avons préparé par ce procédé des antigènes méningococciques A, B, C, correspondant aux variétés actuellement connues des méningocoques.

2° *Teinture de benjoin.*

Même préparation que celle que nous avons indiquée plus haut pour la teinture qui sert à la réaction de floculation des sérums syphilitiques.

B. — TECHNIQUE DE LA RÉACTION.

1° Dans un tube à essai *parfaitement propre et sec*, on mélange en proportions convenables (nous allons les indiquer) l'anti-

(1) On peut laisser l'alcool en contact permanent avec les méningos et filtrer au moment de l'emploi la quantité d'antigène nécessaire.

gène méningococcique et la teinture de benjoin. Nous appelons ce mélange : *mélange initial*.

Nous avons tout d'abord indiqué, pour le mélange initial, la proportion de quatorze parties d'antigène pour une de benjoin parce que nous avons pris pour la réaction la dose minima non flocculante. Nous faisons, du reste, remarquer qu'il n'y aurait aucun inconvénient à employer un mélange initial contenant une dose plus forte de benjoin et qui flocculerait en présence de l'eau physiologique avant l'addition du sérum, car, ici encore — et comme pour les sérums syphilitiques — si un sérum positif intensifie la flocculation, *un sérum négatif jouit de la remarquable propriété de faire redevenir absolument homogène un mélange qui flocculait spontanément*. Aussi avons-nous pris pour nos expériences le mélange initial au sixième (1 benjoin, 5 antigène) qui floccule spontanément mais se montre plus sensible à l'action des sérums positifs. Ce taux s'est montré valable pour tous les antigènes méningococciques que nous avons préparés jusqu'ici (une cinquantaine).

2° Dans des tubes (tubes de 22) *propres et secs*, on verse dans l'ordre suivant (la constitution des émulsions est différente suivant que l'on met le mélange initial *avant* ou *après* l'eau) : 1/10 de cent. cube du mélange initial, puis 5 cent. cubes d'eau physiologique à 8,5 p. 1000, et enfin 1 cent. cube de sérum antiméningococcique *non chauffé*.

Possédant toujours des sérums expérimentaux en quantité suffisante (à l'inverse de ce qui se passe souvent pour les sérums syphilitiques), nous avons pris l'habitude de doubler les doses respectives de réactifs, car, la colonne de liquide étant plus haute, les résultats sont d'une lecture encore plus facile.

Une émulsion, faite dans les mêmes conditions, et placée au contact de sérum normal, sert de témoin.

On met les tubes à l'étuve à 37° et on note le début de la flocculation dans les conditions que nous indiquerons plus loin.

C. — REMARQUES.

1° Le sérum *ne doit pas avoir été chauffé*.

2° Il faut employer du benjoin de *Sumatra* à l'exclusion de tout autre.

3° Lorsqu'on emploie pour la première fois un antigène alcoolique, ou une teinture de benjoin, il faut éprouver leur valeur en présence d'un sérum antiméningococcique dont on connaît l'aptitude à flocluler.

Résultats.

1° *Spécificité de la réaction.*

Un sérum normal ne floclule jamais en présence de notre mélange. Nous avons essayé toutes les variétés de sérums thérapeutiques actuellement préparés par l'Institut Pasteur. *Seuls les sérums antiméningococciques floclulent en présence de l'antigène méningococcique.* Il y a spécificité d'espèce, mais il n'y a pas spécificité de variété. Un sérum méningo A floclule plus fortement et plus vite en présence de l'antigène A, mais il floclule aussi plus ou moins en présence de l'antigène B ou C. Il y a des cofloclulations, comme il y a des coagglutinations.

Depuis cinq ans, nous avons essayé régulièrement tous nos sérums antiméningo par ce procédé. Nous avons fait porter sur un certain nombre de ces sérums des recherches comparatives dont nous allons indiquer les résultats.

2° *Mesure du pouvoir floclulant.*

A. — Dans une première série d'expériences, une quantité de sérum *fixe et égale* (2 cent. cubes) pour chaque origine de sérum est mise au contact de l'émulsion, dans 9 cent. cubes d'eau physiologique, deux dixièmes du mélange initial constitué par une partie de teinture de benjoin et cinq parties d'antigène alcoolique correspondant à la variété du sérum en expérience (par exemple un sérum A est mis en présence d'un antigène A). On porte à l'étuve à 37°.

La lecture est faite de quinze en quinze minutes pendant les trois premières heures, de trente en trente minutes pendant les trois heures suivantes; d'heure en heure jusqu'à la dixième heure; on note enfin les résultats après dix-huit et vingt-quatre heures.

TABLEAU IV. — Chevaux en cours d'immunisation.

NOMBRE DES CHEVAUX	VARIÉTÉ DE MÉNINGOCOQUES	TEMPS D'IMMUNISATION en jours	QUANTITÉ TOTALE d'émulsion reçue en centimètres cubes	ANTIGÈNE	SAIGNÉE du 8 juillet		SAIGNÉE du 10 juillet		SAIGNÉE du 12 juillet		SAIGNÉE du 15 juillet		SAIGNÉE du 17 juillet		SAIGNÉE du 19 juillet		SAIGNÉE du 22 juillet	
					Flocculation au début	H. m.	Flocculation au début	H. m.	Flocculation au début	H. m.	Flocculation au début	H. m.	Flocculation au début	H. m.	Flocculation au début	H. m.	Flocculation au début	H. m.
160	A	80	245	A	30	1	45	2,30	4	5	30	1,30	1	1,30	4,30	2	30	1
167	A	70	140	A	45	2	45	1,30	6	7,30	45	2	4	2	4,30	2	45	4,30
161	B	80	255	B	45	4,45	45	1,30	5	7	30	1,45	2	4	1,15	1,45	1	1,30
162	B	80	255	B	45	45	1	1,30	5,30		30	1,30	1	2,30	30	45	30	1
164	B	70	185	B	1	3	3,30	5	5,30	9	4,45	3,30	3	4	1,30	2	1	2,30
165	B	70	185	B	45	1,30	1,30	2	5,30	8	4,30	2,30	30	4,45	45	1	1	4,30
163	C	80	260	C	2	3	2	3,30	4	8,30	2,30	5	2	4	1,15	1,45	1,15	1,45
169	C	70	220	C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
166	B	70	185	B	1,15	4,45	1,30	2,30	5,30	10	3	4,15	1,30	2,15	1,15	1,45	1,15	1,45

Pour la lecture des résultats, nous distinguons, comme pour les sérums syphilitiques :

Floculation à petits grains. F +
 Floculation à gros grains F ++
 Réunion des floculats en gros amas qui se déposent
 progressivement au fond du tube tandis que le
 liquide surnageant s'éclaircit FT (total).

Le tableau IV et les graphiques des figures 4 et 5 donnent quelques résultats concernant une première série de chevaux qui étaient en voie d'immunisation. Pour ne pas compliquer, nous mentionnons seulement le temps d'apparition de la floculation et le moment où la floculation est complète. Nous indi-

TABLEAU V.

NUMÉRO DES CHEVAUX	VARIÉTÉ de méningocoques	ANTIGÈNE	DÉBUT de la floculation
			H. m.
17.	A	A	15
18.	B	B	45
54.	A	A	1
76.	A	A	2
16.	B	B	1
151.	C	C	1,45
50.	B	B	5
154.	C	C	18
155.	C	C	2

quons le temps d'immunisation et la quantité d'émulsion de méningocoques reçue (l'émulsion est faite à raison de 200 cent. cubes d'eau physiologique pour une boîte de Roux, culture de vingt-quatre heures; les chevaux reçoivent les microbes vivants). On a noté les résultats donnés par les sérums des mêmes chevaux au cours de saignées successives (La dernière inoculation avait été faite aux chevaux le 6 juillet; la première saignée a été faite le 8).

Voici, d'autre part (tableau V), le moment d'apparition de la floculation pour les sérums de chevaux qui, déjà immunisés, reçoivent tous les quinze jours, à titre de dose d'entretien, une injection intraveineuse de 40 cent. cubes d'émulsion de méningocoques (faites dans les conditions que nous avons indiquées plus haut).

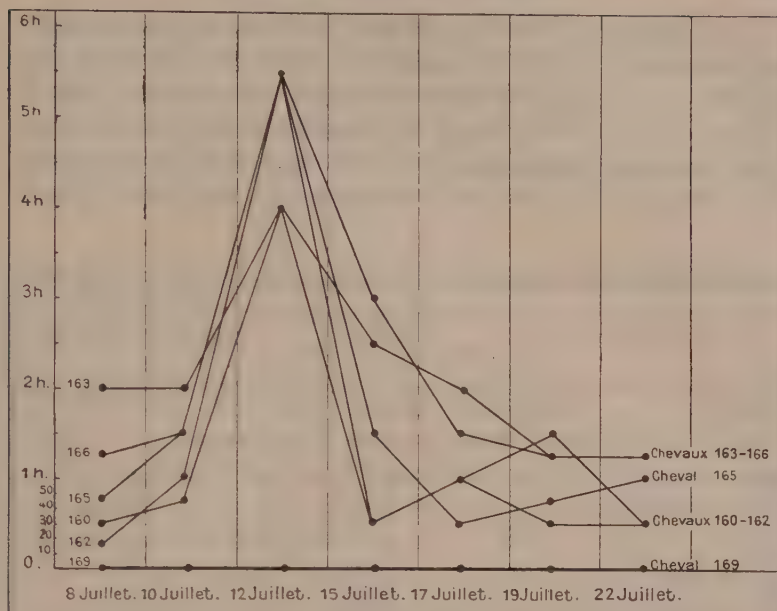


FIG. 4.

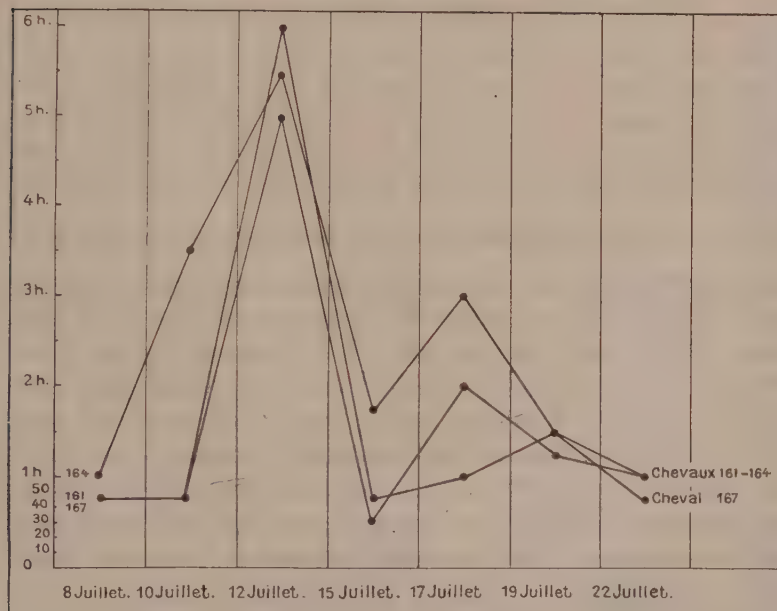


FIG. 5.

FIG. 4 et 5. — Représentation graphique des résultats indiqués dans le tableau IV.

B. — Dans une deuxième série d'expériences, c'est le *temps de contact* qui est *fixe* et la *quantité* de sérum qui *varie*. Les sérums ont été préalablement dilués et une quantité fixe de dilution (2 cent. cubes d'une dilution au demi; 2 cent. cubes d'une dilution au tiers, etc...) est mise en présence de l'émulsion du mélange initial (antigène correspondant au sérum). On lit

TABLEAU VI.

NUMÉRO DES CHEVAUX	VARIÉTÉ DE SÉRUM l'antigène correspondant au sérum	TAUX DE FLOCCULATION
<i>Série I. — Chevaux en cours d'immunisation.</i>		
160	A	1/50
167	A	1/50
161	B	1/50
162	B	1/50
164	B	1/50
165	B	1/50
163	C	1/3
169	C	0
<i>Série II. — Chevaux immunisés recevant des doses d'entretien.</i>		
17	A	1/50
18	B	1/50
34	A	1/50
76	A	1/10
16	B	1/20
151	C	1/10
50	B	1/10
154	C	1/2
153	C	1/2

les résultats après un temps fixe et égal pour tous les sérums (trois heures). Nous considérons comme valables les flocculations qui s'étendent entre 1 et 1/50 et nous ne tenons aucun compte de celles qui se produisent au-dessus de ce taux. Une série d'essais nous a montré que le pouvoir d'homogénéisation que possède un sérum normal ou négatif vis-à-vis d'une émulsion colloïdale de notre antigène méningococcique ne dépasse pas un taux de dilution *qui est toujours supérieur* au 1/50° et qui s'étend entre 1/60° et 1/100°, suivant les origines d'antigènes. Le tableau VI résume les résultats obtenus avec les sérums de mêmes chevaux que ceux des expériences précédentes.

De ces deux groupes d'expériences, retenons, pour le moment qu'il y a des différences sensibles entre les divers sérums méningococciques au point de vue de la rapidité et de la puissance de leur pouvoir flocculant.

L'étude de la rapidité de la flocculation est plus facile que celle du taux limite de flocculation.

3° *Étude comparée des réactions d'opacification, de flocculation et d'agglutination chez les animaux en cours d'immunisation antiméningococcique.*

Nous avons suivi les résultats donnés par ces différentes épreuves chaque semaine, pendant trois mois, chez 4 chevaux en cours d'immunisation et deux fois par mois, pendant huit mois, chez 14 chevaux déjà immunisés et qui reçoivent seulement des doses d'entretien.

A. — *Chevaux en cours d'immunisation.* — Ils reçoivent des doses progressivement croissantes de cultures vivantes de méningocoques émulsionnées dans l'eau physiologique. Les inoculations sont d'abord sous-cutanées, puis intra-veineuses.

Les chevaux ont été examinés avant toute expérience. Leur sérum n'agglutine pas, ne floccule pas. La détermination de leurs groupes sanguins par l'iso-agglutination donne les résultats suivants : Cheval 194 = agglutinines, pas d'agglutinogène ; Chevaux 196, 197, 198 = agglutinogènes, pas d'agglutinine.

TABLEAU VII.

SEMAINES	INOCULATIONS Chevaux	OPACIFICATION				FLOCCULATION			
		194	195	196	197	194	195	196	197
1 ^{re}	s/c	0	0	0	0	0	0	0	0
2 ^e	s/c	0	0	0	0	0	0	0	0
3 ^e	s/c	0	0	0	0	0	0	0	0
4 ^e	s/c	A peine visible.				+ 10 h.	0	0	0
5 ^e	s/c	—				—	0	0	0
6 ^e	i/v 5 c. c.	—				—	0	0	0
7 ^e	i/v 10 c. c.	—				8 h.	0	0	0
8 ^e	i/v 20 c. c.	Opacification forte et persistant après 24 h.				++	T	++	++
						2 h.	1 h.	2 h. 30	2 h. 30
MOYENNES									
12 ^e -20 ^e	i/v 10 c. c. entretien	—				T 1 h.	T 30'	T 1 h. 15	T 1 h 30

SEMAINES	INOCULATIONS Chevaux	AGGLUTINATION			
		194	195	196	197
1 ^{re}	s/c	0	0	0	0
2 ^e	s/c	0	0	0	0
3 ^e	s/c	0	0	0	0
4 ^e	s/c	0	0	0	0
5 ^e	s/c	0	0	0	0
6 ^e	i/v 5 c. c.	0	1/20	0	0
7 ^e	i/v 10 c. c.	0	1/20	0	0
8 ^e	i/v 20 c. c.	1/50	1/200	1/50	1/100
MOYENNES					
12 ^e -20 ^e	i/v 60 c. c.	1/400	1/600	1/500	1/500

+, ++, T, indiquent les degrés de floculation.

Le tableau VII indique les résultats de recherches comparatives. L'agglutination a été faite par la méthode macroscopique; l'opacification et la floculation par la méthode des mélanges antigènes-teintures de résines, gomme-gutte pour l'opacification (1), benjoin pour la floculation.

B. — *Chevaux déjà immunisés.* — Si nous essayons d'analyser les résultats obtenus, nous croyons tout d'abord (tableau VII) que les agglutinines et les floculines apparaissent progressivement, mais qu'il y a un saut brusque au moment où l'inoculation est pratiquée par la voie intra-veineuse et la quantité d'émulsion microbienne injectée déjà importante. La correspondance entre les différentes épreuves n'est pas toujours parfaite, mais on voit certains sérums (193) donner d'emblée de bons résultats avec toutes les méthodes d'examen. En règle générale, la floculation apparaît avant l'agglutination.

Si l'on considère la floculation en particulier (tableau VIII et graphiques figures 6 et 7) on voit qu'il existe : 1^o des sérums qui floculent vite et énergiquement; 2^o d'autres pour lesquels la floculation est nulle ou apparaît tardivement; 3^o des sérums dont la floculation est rapide, mais pour lesquels il y a un grand décalage entre le moment d'apparition de la floculation et celui où elle est devenue totale.

(1) La gomme-gutte donne ici des résultats beaucoup plus constants qu'avec les sérums syphilitiques.

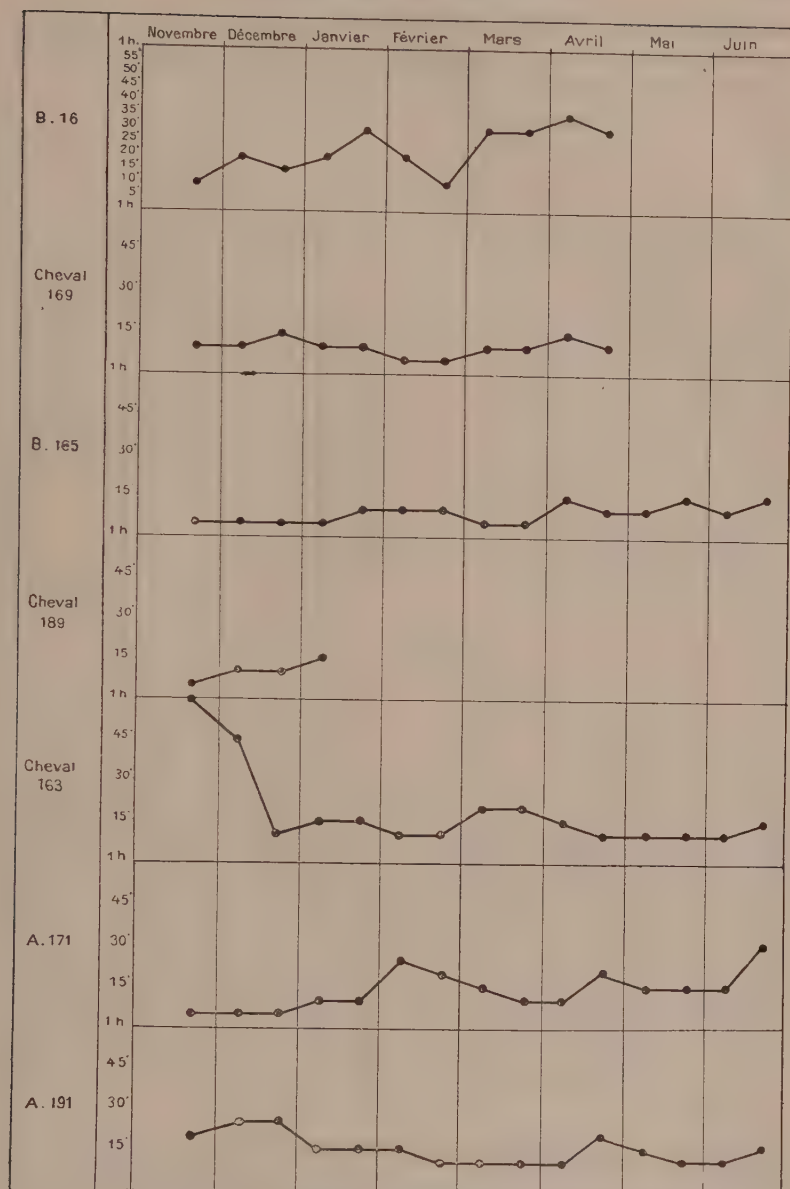


FIG. 6. — Représentation graphique des résultats de la partie supérieure du tableau VIII.

La flocculation met encore en évidence des fluctuations marquées des propriétés physiques des sérums au cours de

l'immunisation. Elle montre aussi que le pouvoir flocculant peut, pour certains chevaux, apparaître ou même augmenter si les

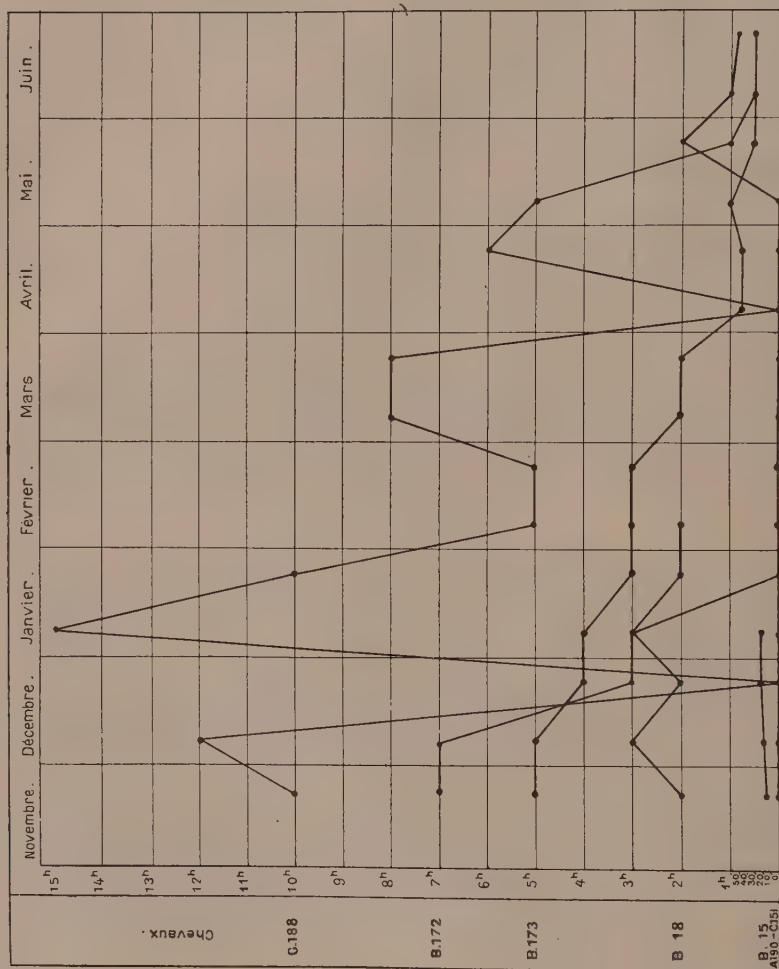


Fig. 7. — Représentation graphique des résultats de la partie inférieure du tableau VIII.

injections immunisantes sont répétées pendant assez longtemps.

Le fait essentiel qui se dégage de ces recherches est le suivant : certains chevaux se détachent nettement du groupe des autres, qu'ils distancent de loin, par l'intensité et surtout la rapidité de flocculation de leur sérum. Tel est le fait qu'apporte

TABLEAU VIII.

MOIS	CHEVAUX													
	B 16		C 169		B 165		C 189		C 163		A 171		A 191	
	DF	FT	DF	FT	DF	FT	DF	FT	DF	FT	DF	FT	DF	FT
Novembre.	10'	30'	10'	45'	5'	20'	5'	20'	1h	4h	5'	20'	20'	45'
Décembre.	20'	1'	10'	1h15	5'	1h	10'	1h	45'	1h30	5'	1h	25'	1h30
Décembre.	15'	30'	15'	1h30	5'	40'	10'	4h	10'	45'	5'	30'	25'	1h
Janvier . .	20'	30'	10'	45'	5'	30'	15'	2h	15'	30'	10'	30'	15'	35'
Janvier . .	30'	1h	10'	1h15	10'	1h			15'	1h	10'	1h	15'	50'
Février . .	20'	30'	5'	35'	10'	45'			10'	30'	25'	1h	15'	2h
Février . .	10'	30'	5'	45'	10'	30'			10'	45'	20'	1h	10'	30'
Mars . . .	30'	1h15	10'	1h15	5'	1h			20'	1h	15'	1h30	10'	30'
Mars . . .	30'	1h15	10'	1h15	5'	45'			20'	1h15	10'	1h	10'	1h
Avril . . .	35'	1h	15'	2 h	15'	1h			15'	1h15	10'	3h	10'	1h15
Avril . . .	30'	1h15	10'	1h30	10'	1h30			10'	2h	20'	2h30	20'	1h15
Mai					10'	2h			10'	1h	15'	2h	15'	2h30
Mai					15'	1h30			10'	1h15	15'	2h15	10'	2h
Juin					10'	1h15			10'	1h	15'	2h	10'	2h
Juin					15'	1h30			15'	30'	30'	1h	15'	1h

MOIS	CHEVAUX													
	B 15		B 18		B 173		C 188		B 172		C 151		A 190	
	DF	FT	DF	FT	DF	FT	DF	FT	DF	FT	DF	FT	DF	FT
Novembre.	10'	45'	2h	2h	5h	2h	10h	2h	7h	30h	0	0	0	0
Décembre.	1h5	2h	3h	2h	5h	2h	12h	30h	7h	2h	0	0	0	0
Décembre.	20'	45'	2h	18h	4h	5h	0	0	3h	10h	0	0	0	0
Janvier . .	20'	50'	3h	15h	4h	10h	15h	2h	3h	8h	0	0	0	0
Janvier . .			2h	10h	3h	5h	10h	2h	0	0	0	0	0	0
Février . .			2h	15h	3h	5h	5h	2h			0	0	0	0
Février . .					3h	5h	5h	10h			0	0	0	0
Mars					2h	10h	8h	20h			0	0	0	0
Mars					2h	10h	8h	20h			0	0	0	0
Avril					45'	3h	0	0			0	0	0	0
Avril					45'	5h	6h	2h			0	0	0	0
Mai					1h	3h	5h	2h			0	0	0	0
Mai					30'	3h	1h	3h			2h	5h	0	0
Juin					30'	4h	30'	2h			1h	3h	0	0
Juin					30'	2h	30'	1h30			45'	3h	0	0

DF, début de floculation ; FT, floculation totale.

le laboratoire. Des recherches comparées, sérologiques et cliniques établiront si, à ces propriétés physiques du sérum, correspond un pouvoir thérapeutique élevé.

III. — Essais de floculation d'autres sérums en présence d'antigènes correspondants.

A. — SÉRUMS GONOCOCCIQUES.

Nous avons pensé obtenir un rythme de floculation comparable à celui des sérums antiméningos, en mettant des sérums gonococciques en présence d'extraits alcooliques de gonocoque, germe voisin du méningocoque. Notre technique a été en tous points comparable dans les deux cas. Nous avons utilisé des gonocoques d'origines diverses (1) et la macération dans l'alcool a duré au moins un mois. Le mélange d'antigène (5 parties) et de teinture de benjoin de Sumatra (1 partie) est émulsionné dans l'eau physiologique; il est indispensable d'ajouter une quantité notable de sérum : au minimum 1 cent. cube.

Nous avons, dans ces conditions, constaté une floculation très nette avec le sérum antigonococcique expérimental et avec les sérums de malades atteints de manifestations gonococciques diverses; l'absence de floculation est complète avec le sérum normal, avec divers sérums thérapeutiques et avec le sérum d'individus non suspects d'infection gonococcique (jeunes garçons de dix à douze ans).

Nous signalons cette floculation pour l'intérêt qu'elle peut présenter au point de vue physico-chimique car, au point de vue pratique, il nous a paru difficile de déterminer avec précision si de pareilles réactions correspondent à une infection encore en évolution, ou si elles témoignent simplement de la persistance d'un état physique du sérum après une infection guérie (comparable à la persistance du pouvoir agglutinant du sérum longtemps après la guérison clinique d'une fièvre typhoïde).

B. — SÉRUMS TYPHIQUES.

Avec des extraits alcooliques de bacille typhique, de para A ou B (extrait par macération ou au Soxhlet), on obtient une

(1) Nous remercions M. le Dr Salimbeni d'avoir bien voulu mettre à notre disposition l'importante collection de gonocoques qu'il conserve pour la préparation du vaccin.

floculation nette en présence des sérums correspondants.

V. Georgesco a étudié à ce point de vue les sérums de 85 malades atteints de fièvre typhoïde. La floculation par notre procédé était faite concurremment avec le sérodiagnostic de Widal (et avec l'examen clinique). La concordance a été de 100 p. 100. Bien entendu, dans chaque cas un sérum normal servait de témoin.

MM. Weinberg, A. R. Prévot et P. Goy, étudiant la floculation des sérums agglutinants par des filtrats de cultures microbiennes, ont proposé un « floculo-diagnostic » des maladies infectieuses.

« Dujarric de la Rivière et Ét. Roux, disent-ils, ont réussi la floculation en mettant le sérum typhique en contact avec l'extrait alcoolique de bacille d'Eberth additionné de teinture de benjoin. Nous avons obtenu une floculation très nette avec les filtrats de cultures éberthiennes. Il est donc évident que lorsqu'on pratique la réaction de Widal avec une culture totale, l'intensité du phénomène observé est liée à la fois à l'agglutination de microbes et à la floculation des produits de désintégration microbienne. »

C. — SÉRUMS TUBERCULEUX.

Nous avons étudié avec notre collaborateur L. Gallerand les propriétés physico-chimiques des émulsions dans l'eau physiologique d'un mélange d'antigène tuberculeux et résine. Le benjoin nous avait donné des résultats inconstants, peut-être parce que nous l'avions employé en solution dans l'alcool éthylique, alors que l'antigène tuberculeux était fabriqué avec de l'alcool méthylique. Nous avons eu de meilleurs résultats avec la gomme-gutte et la technique de la réaction que nous avons proposée est la suivante :

1° Les réactifs nécessaires sont :

a) L'antigène tuberculeux méthylique de Boquet et Nègre : cet antigène qui est de conservation facile et indéfinie est préparé avec un mélange de bacilles tuberculeux bovins et humains cultivés sur bouillon glycérimé ordinaire. Les cultures âgées de six semaines sont stérilisées par trente minutes de chauffage à 120°, filtrées sur papier et mélangées en parties

égales. Les corps bacillaires sont lavés sur filtre, avec de l'eau distillée, puis séchés dans le vide ou à l'étuve à 37°. Les microbes secs sont traités par de l'acétone pendant vingt-quatre heures (1 cent. cube d'acétone par centigramme de bacilles), desséchés de nouveau, et finalement macérés pendant douze jours à 37° dans de l'alcool méthylique à 99° aussi pur que possible (1 cent. cube d'alcool par centigramme de bacilles). On agite fréquemment, et le liquide, séparé par filtration du dépôt de microbes, constitue l'antigène.

b) Une teinture au 1/10 de gomme-gutte que nous avons faite dans l'alcool *méthylique* pour être dans les mêmes conditions que celles de l'antigène.

2° On fait un mélange (mélange initial) au 1/6 d'antigène méthylique de Nègre et Boquet (5 parties) et de teinture de gomme-gutte (1 partie).

3° On porte 0 c. c. 1 de ce mélange initial dans 5 cent. cubes d'eau physiologique; on agite doucement. Le mélange est opalescent.

4° On ajoute 1 cent. cube du sérum à l'étude (sérum frais, non chauffé), puis 1 goutte d'une solution au 1/10 d'acide acétique dans l'eau distillée: avec les sérums tuberculeux, l'opacité se maintient ou augmente; avec les sérums normaux, le liquide s'éclaircit.

A la température du laboratoire, la réaction se produit en quelques minutes. Elle est plus lente lorsque les sérums ont été prélevés depuis plusieurs jours. Nous avons constaté ce fait sur des sérums que nous avons examinés successivement pendant plusieurs jours. Dans les conditions d'expérience que nous venons d'indiquer, des sérums provenant des syphilitiques, mais non tuberculeux, n'ont pas donné d'opacification.

Une centaine de sérums que nous avons examinés nous ont montré la concordance des résultats de cette méthode d'opacification avec les données cliniques et avec la réaction de déviation du complément.

DEUXIÈME PARTIE

MÉCANISME DE LA FLOCCULATION

Action de certains agents sur la flocculation,

I. — AGENTS PHYSIQUES ET BIOLOGIQUES.

A. — *Saturation des sérums.* — Les expériences sur les sérums méningos que nous venons de décrire ont été faites avec des sérums qui n'avaient subi aucune préparation. Nous avons voulu savoir si les sérums saturés suivant la méthode que nous avons publiée avec Dopter, c'est-à-dire les sérums que des agglutinations successives ont privés de leurs coagglutinines, conservaient leur pouvoir flocculant. Les expériences nous ont prouvé que ce pouvoir est conservé. Toutefois la saturation enlève une partie du pouvoir flocculant (qui est encore assez net pour la pratique); il ne faut pas oublier, d'autre part, que le sérum saturé est un sérum dilué au 1/10; il y a intérêt à ne saturer que des sérums qui agglutinent fortement.

Inversement; il était intéressant de savoir si un sérum dont on aurait épuisé le pouvoir flocculant pourrait encore agglutiner des méningocoques ou dévier le complément. Les expériences ont été faites dans les conditions suivantes :

Dans un premier temps, on épuise le pouvoir flocculant d'un sérum antiméningococcique en présence du mélange de benjoin et d'extraits alcooliques de méningocoque; par exemple, un sérum méningo A est mis à flocculer pendant vingt-quatre heures avec un extrait méningo A; au bout de ce temps, on centrifuge et le liquide décanté est mis à flocculer avec un extrait B, puis avec un extrait C.

Dans un deuxième temps, le sérum dont le pouvoir de flocculation a été ainsi épuisé et qui a été soigneusement débarrassé par centrifugation des flocculats, est utilisé :

1° Pour l'agglutination en présence d'une émulsion dans l'eau physiologique de méningocoques d'une culture de vingt-

quatre heures sur gélose (en tous points la technique habituelle des agglutinations). L'agglutination par le procédé rapide se fait aussitôt et très énergiquement. Par le procédé lent, elle se fait aussi très bien et le taux agglutinatif a peu ou pas baissé (cela dépend des sérums).

2° Pour la déviation du complément avec, comme antigène, des corps microbiens. La déviation est très nette, aussi nette qu'avec un sérum qui n'a pas déjà servi à la floculation.

Il apparaît donc que *la floculation n'a enlevé du sérum ni les agglutinines ni les sensibilisatrices* et qu'elle doit par conséquent être considérée comme différente et même indépendante des réactions d'agglutination ou de déviation du complément qui sont les deux réactions biologiques à l'aide desquelles on caractérise le plus habituellement les sérums préparés avec divers antigènes.

B. — *Filtration des sérums.* — La préparation des sérums saturés (nous parlons ici des sérums dépouillés par l'agglutination de leurs co-agglutinines) exigeant de nombreuses manipulations qui multiplient les chances de contamination, nous avons pris l'habitude de filtrer à la bougie nos sérums saturés dès que leur préparation était terminée. Cette méthode nous avait à l'usage paru supérieure à toute autre (disons en passant que la filtration est facile puisque les sérums saturés sont des sérums dilués au 1/10°).

Une question se posait : ces sérums ainsi filtrés sont-ils encore utilisables pour la floculation ? L'expérience répond par l'affirmative. La filtration du sérum méningococcique, soit ordinaire (dilué), soit saturé (filtration sur bougie Chamberland L², pression : 20 millimètres ; durée : quelques minutes), ne modifie pas les propriétés floculantes de ces sérums.

II. — AGENTS PHYSIQUES ET CHIMIQUES.

Nous avons spécialement étudié l'action de la chaleur combinée à celle de divers antiseptiques.

Après chauffage à 56° pendant trente minutes, trois jours de suite, le pouvoir floculant des sérums méningococciques est à peine diminué. Dans les mêmes conditions d'expérience, le pouvoir agglutinant disparaît. Les résultats, au point de vue

floculation sont sensiblement les mêmes, que le sérum ait été chauffé, une, deux ou trois fois.

L'addition au sérum *chauffé* soit de formol seul (dans la proportion de 1/2 000°), soit de sulfate d'ortho-oxyquinoléine seul (dans la proportion de 1/5 000°) soit de ces deux substances *empêche toute floculation*. En présence d'un antigène qui floccule spontanément, les sérums ainsi traités amènent une homogénéisation rapide et énergique. Le résultat est le même, que les antiseptiques aient été ajoutés au sérum *avant* ou *après* chauffage.

Dans les mêmes conditions :

1° Le sérum additionné de ces antiseptiques, soit séparément soit conjointement mais non *chauffé*, floccule normalement et complètement.

2° Lorsque les antiseptiques sont ajoutés, soit séparément, soit conjointement à l'antigène avant l'addition de sérum chauffé, la floculation se produit : totale pour la quinoléine, elle laisse, après vingt-quatre heures, un léger trouble pour le formol ou le mélange de formol-sulfate d'oxyquinoléine ; le résultat est le même, que les antiseptiques restent ou non en contact prolongé avec l'antigène avant l'addition du sérum chauffé.

3° Si les antiseptiques sont ajoutés à l'antigène, avant addition de sérum et qu'on emploie du sérum *non chauffé*, la floculation est totale dans tous les cas.

Si on ajoute du phénol aux sérums, la floculation, faible pour la solution à 1/2 000°, est nette pour la solution à 1/5 000° ajoutée au sérum *chauffé* ; il reste cependant un trouble persistant dans le liquide surnageant. Pour le permanganate de potasse : une solution forte (1/4 000°) ajoutée au sérum chauffé (donnant une précipitation immédiate), gêne beaucoup ultérieurement la floculation, mais une solution faible (1/4 000°) ne la gêne en rien. Le résultat est le même, que les antiseptiques aient été ajoutés au sérum avant ou après chauffage. Si les antiseptiques sont ajoutés à l'antigène et qu'on emploie un sérum *non chauffé*, la floculation est nette, totale même dans le cas d'une solution forte de permanganate.

Ainsi pour les actions combinées — elles doivent être totalisées, mais il n'est pas indispensable qu'elles soient simultanées

— de la chaleur et de quelques antiseptiques, *il se produit une modification profonde de l'état physique des sérums antiméningococciques*. Cette modification se traduit notamment par le fait que *ces sérums ne floclent plus en présence de l'antigène méningococcique et qu'ils ont entièrement récupéré le pouvoir défloculant énergétique que tout sérum possède normalement*.

Seul le sérum est modifié et la floculation continue à se produire quand les antiseptiques sont ajoutés à l'*antigène*. Certains antiseptiques ne détruisent pas le pouvoir floculant des sérums : c'est le cas du permanganate employé en solution faible.

Mécanisme.

I

Dans toutes les réactions que nous venons de décrire, le rôle du benjoin que nous ajoutons à l'antigène nous paraît être de rendre la floculation *macroscopique, c'est-à-dire visible sans l'aide d'aucun instrument d'optique*.

En réalité, la floculation a bien lieu par action réciproque du sérum et de l'antigène, mais les particules qui résultent de la précipitation sont bien trop fines pour être perçues à l'œil nu. En changeant l'état physique du mélange, le benjoin groupe les fines particules et donne des flocons facilement visibles. Le phénomène pourrait s'expliquer de la façon suivante : l'émulsion d'antigène est une émulsion colloïdale et, dans les conditions où nous opérons, l'ensemble des éléments qui la composent est en équilibre, équilibre fragile en vérité. Si nous ajoutons un sérum floculant, cet équilibre sera rompu, mais l'expérience prouve qu'il se rompra très lentement et en groupant des particules très fines. Or, si on adjoint au mélange un corps comme le benjoin qui, au moment où l'équilibre tend à se rompre, vient changer brusquement et fortement l'état physique, la floculation s'accélère et s'intensifie : autour des noyaux déjà existants, viennent se grouper des particules qui arrivent à former des flocons de plus en plus gros, facilement visibles à l'œil nu.

On connaît, du reste, des phénomènes comparables. On sait depuis les travaux de Rutherford et de Millikan, en particulier, que ce sont les ions qui provoquent dans l'atmosphère les phénomènes de condensation, sortes de noyaux électrisés attirant des molécules de vapeur d'eau, chaque ion groupant les éléments d'une gouttelette.

Cette conception du mécanisme de la réaction que nous avons proposée nous permet maintenant de comprendre un certain nombre de faits :

1° Et tout d'abord celui qu'apporte l'expérience et que nous avons déjà signalé plusieurs fois : lorsqu'on met dans le mélange antigène-benjoin une quantité assez forte de benjoin pour que ce mélange floccule spontanément en présence de l'eau physiologique, on constate que l'addition d'un sérum méningococcique (ou syphilitique suivant les cas) *intensifie* la flocculation, tandis que dans les mêmes conditions un sérum normal jouit de la propriété de *faire redevenir absolument homogène* un mélange qui déjà flocculait.

Ce fait très remarquable et qui est de nature à nous rassurer sur la possibilité de fausses réactions positives (c'est-à-dire de flocculation avec un sérum normal) cadre bien avec ce que nous pensons actuellement de l'équilibre physico-chimique du milieu biologique.

On sait, en effet, que les éléments qui constituent la cellule s'y trouvent à l'état colloïdal. A l'état normal il y a équilibre. Sans doute cet équilibre est instable et à tout moment des sollicitations venues du dehors et qui sont la conséquence d'échanges nutritifs, d'édification ou de désintégration des matériaux cellulaires, tendraient à le rompre. Elles y réussissent parfois (flocculation) *à l'état pathologique*. Mais *à l'état normal* l'équilibre est assuré d'une façon constante. Et c'est pourquoi un sérum normal possède cette propriété commune à tous les éléments vitaux de pouvoir, non seulement maintenir l'équilibre des colloïdes mais, jusqu'à un certain point, de rétablir cet équilibre si le mélange se met à flocculer.

2° Cette conception du mécanisme de notre réaction permet encore de comprendre que celle-ci *n'est pas une application au sérum sanguin de la méthode que M.M. Guillain, Laroche et*

Lechelle ont indiquée pour le liquide céphalo-rachidien. Ces auteurs utilisent, en effet, pour leur réaction, uniquement de la teinture de benjoin. Or, l'expérience nous a prouvé, comme à bien d'autres auteurs, que cette technique est inapplicable au sérum sanguin. La mise en présence des sérums sanguins avec une émulsion de benjoin, quelles que soient les conditions de doses, de temps et de température, ne donne aucun résultat intéressant. L'originalité de notre méthode consiste, au contraire, dans le mélange d'un antigène et d'une teinture de résine, la réaction antigène étant rendue plus intense et plus facilement lisible par l'action de la résine, dont le rôle est de grouper les flocculats. En un mot, la réaction de Guillain est une réaction liquide céphalo-rachidien-résine; la nôtre est une réaction sérum-antigène avec un indicateur.

3° Le rôle que nous accordons au benjoin nous fait comprendre aussi que notre réaction marche avec tout bon antigène syphilitique, et nous avons souvent utilisé à côté de l'antigène Bordet et Ruelens des antigènes cœur humain ou cœur de cheval (péréthynol de Vernes).

4° On pourrait aussi, du reste, remplacer la teinture de benjoin par d'autres *teintures de résines*, avec plus ou moins d'avantages suivant la nature et la composition chimique de celles-ci. Certaines ont d'autres propriétés que nous avons utilisées; rappelons par exemple le cas de la gomme-gutte.

II

Est-il possible de serrer de plus près le problème et de voir quel est, dans la teinture de benjoin, le composant qui a sur la flocculation cette action favorisante; les benjoints fournis par le commerce sont en effet de valeur inégale et il eût été intéressant de faire intervenir dans la réaction un produit de composition définie. L'expérience a montré que, pour les flocculations, le benjoin de *Sumatra* doit être employé à l'exclusion du benjoin de Siam. Or, l'analyse chimique montre que le benjoin de Sumatra contient de l'acide cinnamique et de l'acide benzoïque, tandis que le benjoin de Siam ne contient pas d'acide cinnamique ou n'en contient que des traces. Voici, en effet, deux analyses de ces résines :

La première est celle du *Codex medicamentarius gallicus*, 1908 :

Benjoin de Sumatra :

Acide benzoïque libre	13 à 18 p. 100
Résine. { Ether cinnamique de Benzoëresinol $C^{18}H^{20}O^3$. . . }	70 à 80 p. 100
{ Ether cinnamique de Sumarésitanol $C^{18}H^{20}O^4$. . . }	
Vaniline moins de 1 p. 100.	
Huile essentielle. { En très petite quantité.	
Styrol. }	

Benjoin de Siam :

Acide benzoïque libre : quantité moindre que dans le benjoin de Sumatra.	
Résine. { Ether benzoïque de Benzoëresinol. { En quantité un peu plus élevée	que dans du benjoin de Sumatra.
{ Ether benzoïque de Siarésitanol. }	
Vaniline 1,5 p. 100.	

La seconde a été faite par M. Machebœuf (1) :

Benjoin de Sumatra :

Acide benzoïque libre	15 p. 100
Acide benzoïque combiné	3 —
Acide cinnamique combiné aux résines	6 —
Vaniline.	

Benjoin de Siam :

Acide benzoïque libre	5 —
Acide benzoïque combiné à l'état d'éther avec les résines	9 —
Acide cinnamique	Traces.
Vaniline.	

Des nombreux essais que nous avons effectués il résulte que chacun des deux acides — benzoïque et cinnamique — employés séparément ne donne qu'une flocculation minime, même si on emploie des doses relativement élevées. Employés ensemble ils ont une action plus favorable mais non encore égale à celle de la teinture de benjoin. De plus, ces acides, bien que seuls acides entrant dans la composition du benjoin, ne sont pas spécifiques, car on obtient le même degré de flocculation en les remplaçant par de l'acide citrique par exemple.

Restait à étudier l'action de la résine, soit seule, soit unie à

(1) M. MACHEBOEUF cité dans Guillaïn, Laroche, Lechelle : La réaction du benjoin colloïdal, Masson, édit., 1922.

l'un des deux acides; mais il est difficile de séparer complètement la résine de benjoin des acides qu'elle contient. Nous avons donc utilisé une autre résine : la gomme-gutte (teinture alcoolique au 1/10) qui ne contient ni acide cinnamique, ni acide benzoïque. La gomme-gutte seule floccule peu et lentement; elle floccule mieux lorsqu'on lui ajoute l'un des deux acides cinnamique ou benzoïque. Mais si on additionne la gomme-gutte à la fois d'acide cinnamique et d'acide benzoïque, réalisant ainsi un complexe assez analogue à la résine de benjoin naturelle, on constate une floculation rapide et abondante assez comparable à celle qu'on obtient avec la teinture de benjoin. Il semble donc qu'un mélange de résine et d'acides soit nécessaire pour obtenir une bonne floculation.

Il faut vraisemblablement chercher l'explication de ces phénomènes dans le fait que les acides rapprochent la résine de son point iso-électrique et facilitent en conséquence la floculation.

III. — RÉACTION DU MILIEU, *pH*.

Au cours des essais dont nous venons de parler, nous avons noté l'importance, pour la floculation, de la réaction du milieu. Les acides forts (SO_4H_2 , HCl) et certaines bases (telles que NaOH) permettent difficilement de suivre la floculation, car dès que l'acidité ou l'alcalinité sont un peu fortes, la floculation s'arrête. Nous avons été amenés à employer des méthodes moins brutales.

Pour nos essais, nous avons utilisé d'abord les indicateurs colorés : le pourpre de bromocrésol (dibromocrésolsulfonephthaléine) et surtout le rouge de phénol (phénolsulfonephthaléine). Ce dernier nous a permis en outre de faire la constatation suivante : lorsqu'on ajoute à des émulsions colloïdales pourvues d'indicateur coloré, d'une part un sérum thérapeutique et d'autre part un sérum normal, on voit immédiatement une différence de teinte se produire, l'émulsion contenant le sérum normal étant la plus colorée (si le sérum thérapeutique contenait du formol, on ajoute au sérum normal la même quantité de cet antiseptique). Mais au fur et à mesure que la floculation se produit, la teinte de l'émulsion contenant le sérum thérapeutique tend à s'équilibrer avec celle de l'émul-

sion contenant le sérum normal. Au bout de vingt-quatre heures, lorsque la floculation est complète, cet équilibre est établi.

On voit de même, dans une autre série d'expériences que nous avons pratiquées, les flocculats fixer certaines matières colorantes, le bleu à l'eau par exemple (Wasserblau); dans le cas d'un sérum thérapeutique, le culot de floculation seul est bleu, le liquide surnageant étant devenu presque incolore, alors qu'une émulsion contenant un sérum normal reste d'un bleu uniforme. Pour ces expériences, le rouge congo que nous avons utilisé aussi s'est montré moins favorable.

Ces premiers essais avec des indicateurs de pH nous ayant donné une orientation intéressante, nous avons poursuivi des recherches sur ce sujet dans des conditions plus précises.

Les mesures de pH furent faites par la méthode électrométrique (électrode d'hydrogène) avec un potentiomètre de précision donnant avec certitude le demi-millivolt. Des tubes sont soigneusement lavés à l'acide, à l'eau, à la vapeur, puis fermés par des bouchons paraffinés. On y introduit l'extrait en émulsion dans l'eau physiologique (0 c. c. 3 d'extrait pour 15 cent. cubes d'eau); pour ces mesures, l'équilibre est assez lent à s'établir, car les extraits contiennent de grandes quantités de composés organiques non saturés.

Nous avons essayé un nombre important de résines d'origines diverses (1); avec les résines finement pulvérisées on préparait des teintures au 1/10 dans l'alcool absolu. On les conservait soigneusement bouchées, dans des flacons colorés, eux-mêmes enfermés dans une armoire; l'expérience nous a montré, en effet, que sous l'influence de l'air et de la lumière le pH des émulsions de ces teintures varie sensiblement. Nous avons poursuivi concurremment pour chaque teinture de résine la mesure du pH , l'étude du pouvoir flocculant et du pouvoir d'opacification en présence de l'antigène méningo et du sérum correspondant :

(1) Nous tenons à remercier très vivement : l'Agence Économique du Gouvernement général de l'Afrique occidentale française; l'Agence économique du Gouvernement de l'Indo-Chine, l'Agence économique de Madagascar; le Laboratoire colonial de Paris; la Compagnie de navigation d'Extrême-Orient; les maisons Denis frères, Alland et Robert, Lemoine qui nous ont très aimablement fourni de nombreux échantillons de résines.

Dans le tableau ci-après :

Op., opacification; Op. lég., opacification légère; F +, F ++, Ft, divers degrés de floculation; Nég., négatif (pas de floculation ou pas d'opacification).

N°	RÉSINES	pH	OPACIFICATION	FLOCULATION
301	Benjoin Sumatra P.	3,88	Op. lég.	Ft.
302	Benjoin Sumatra C.	4,02	Op.	Ft.
303	Gomme-gutte C.	4,25	Op.	F ++
304	Gomme-gutte P.	4,41	Op.	F ++
305	Gomme Kino P.	6,52	Nég.	Nég.
306	Gomme Bdellium P.	6,75	Op. lég.	Nég.
307	Gomme copal P.	6,49	Op. lég.	Nég.
308	Stick-laque (Pierre Lecoq); Anvers. Denis.	5,48	Nég.	Nég.
309	Grabeaux nettoyés; Alland et Robert.	8,06	Nég.	Nég.
310	Gomme de Gây-tram. Cochinchine; Gt Indo-Chine	8,42	Nég.	Nég.
311	Gomme adragante; Alland et Robert.	8,61	Nég.	Nég.
312	Seedlac. Cambodge. Gt Indo-Chine.	6,30	Nég.	Nég.
313	Stick-laque Son-La (Tonkin); bassin de la Rivière Noire.	6,71	Nég.	Nég.
314	Shell lac. Usine de La-pho (Tonkin); Gt Indo-Chine	6,54	Op. lég.	Nég.
315	Résine Chou-Kong. Gt Indo-Chine .	6,03	Op.	Nég.
316	Résine de Kampot (Denis).	8,00	Nég.	Nég.
317	Sticklaque de Siam (Denis).	6,05	Op. lég.	Nég.
318	Gomme blonde n° 900; Alland et Robert.	7,91	Nég.	Nég.
319	Stick-lac de la région de Hoi-Xuan (Bassin du Haut Song-Ma) Confins de l'Annam, Laos et Tonkin; ré- colte en forêt. Gt Indo-Chine. . .	6,08	Nég.	Nég.
320	Gomme-gutte Cambodge. Gt Indo- Chine.	4,52	Op.	F +
321	Benjoin Laos. Gt Indo-Chine. . . .	4,42	Nég.	Nég.
322	Gomme-gutte Saïgon (Denis). . . .	4,43	Op.	F ++
323	Résine de Mu-U (Calophyllum ino- phyllum). Cochinchine. Gt Indo- Chine.	6,29	Op. lég.	Nég.
324	Stick-lac du Cambodge Cie Nav. Extrême-Orient	6,09	Nég.	Nég.
325	Gomme Damarde Singapore (Denis).	6,86	Op. lég.	Nég.
326	Stick-lac de Saïgon (Denis). . . .	6,55	Nég.	Nég.
327	Button-lac du Tonkin (Denis). . . .	6,27	Nég.	Nég.
328	Gomme de vientiane Khisi mai Khen (Denis).	8,04	Op. lég.	Nég.
329	Stick-lac Tonkin (Denis).	6,40	Nég.	Nég.

(métachromatisme app.
teinte améthyste).

N°	RÉSINES	pH	OPACIFICATION	FLOCCULATION
330	Seedlac de Pnom-Penh préparée à la main (Denis).	6,50	Nég.	Nég.
331	Seedlac du Siam (Witt).	6,64	Nég.	Nég.
332	Gomme Bdellium du Soudan (A. O. F.).	7,74	Nég.	Nég.
333	Gomme sterculia (Alland et Robert).	7,36	Nég.	Nég.
334	Stick-lac (Muongs) (Gt Indo-Chine).	7,64	Op. lég.	Nég.
335	Button-lac. Usine de La-pho (Tonkin). Gt Indo-Chine	7,22	Nég.	Nég.
336	Gomme friable du Soudan (A. O. F.).	8,64	Nég.	Nég.
337	Gomme copal de Guinée (A. O. F.).	6,83	Nég.	Nég.
338	Gomme arabique de Guinée (A. O. F.).	7,92	Nég.	Nég.
339	Gomme-gutte Cambodge (Expos. coloniale Marseille). Gt Indo-Chine	4,67	Op.	F ++
340	Stick-lac de Khi-Ky, Haut Song-Ca, Confins de l'Annam et du Laos (Gt Indo-Chine).	8,40	Nég.	Nég.
341	Résines de Chlon-Kong employées pour le calfatage des pirogues (Gt Indo-Chine)	8,40	Nég.	Nég.
342	Gomme arabique de Mauritanie (A. O. F.).	8,54	Nég.	Nég.
343	Résine de la province de Bassac (Cambodge) Gt Indo-Chine.	7,63	Nég.	Nég.
344	Gomme-gutte Lemoine.	5,15	Op.	F.
345	Damar de Batavia (Expos. coloniale Marseille (Gt Indo-Chine)	5,87	Nég.	Nég.
346	Damar blanc Annam (Gt Indo-Chine).	5,84	Nég.	Nég.
347	Gomme arabique. Cercle de Pador. Sénégal (A. O. F.).	6,78	Nég.	Nég.
348	Damar provenance inconnue. Gt Indo-Chine.	5,82	Op. lég.	Nég.
349	Benjoin de Sumatra (Labor. colonial de Paris	3,93	Op. lég.	Fl.
350	Kijy (Agence Eco. Madagascar)	6,01	Op.	Nég.
351	Ramy (Agence Eco. Madagascar).	5,29	Op.	Nég.
352	Copal (Agence Eco. Madagascar).	6,12	Op. lég.	Nég.
353	Copal de Singapore (Denis)	4,91	Op. lég.	Nég.
354	Copal P.	6,19	Op. lég.	Nég.

On voit que, d'une façon générale, l'opacification se produit rarement au-dessus de pH 6 et que la floculation a lieu seulement avec des résines dont le pH est au-dessous de ce chiffre.

Enfin la réaction du milieu n'est pas seule en jeu. Certaines substances modifiant la tension superficielle influent sur la floculation. Lorsque, dans une émulsion colloïdale qui, additionnée d'un sérum méningococcique, floccule à gros flocculats, on ajoute une petite quantité de citrate de lanthane, on voit se

produire une défloculation (1). Si on remet le mélange à l'étuve on voit la floculation se reproduire au bout de quelques heures, mais à la moindre agitation l'émulsion reprendra son homogénéité tandis que dans le témoin, dépourvu de lanthane, les floculats resteront séparés les uns des autres.

Remarquons en passant que ce phénomène peut être obtenu avec des agglutinats microbiens (B. typhique, méningocoque) dans certaines conditions d'expérience, du reste difficiles à réaliser.

*
* *

Les recherches sur la floculation que nous venons d'exposer doivent venir se placer dans le cadre d'études qui tendent à orienter la bactériologie vers l'application de certaines données de la chimie physique.

D'importants progrès ont déjà été réalisés dans le sens de cette évolution. Nous en apportons ici quelques exemples; ils serviront à situer nos recherches et à bien indiquer dans quel esprit et dans quel sens général elles ont été poursuivies.

La qualité des milieux de culture joue en bactériologie un rôle considérable, bien plus considérable que ne le pensent certains bactériologistes qui laissent volontiers à des aides le soin de préparer ces milieux. L'alcalinisation, en particulier, est un temps délicat. Or, l'emploi du papier de tournesol ou de la méthode titrimétrique avec de la phénolphtaléine comme indicateur, indépendamment de l'absence de point de virage précis, ne donne pas une mesure exacte de l'acidité ou de l'alcalinité libre des milieux de culture. Il existe, en effet, dans ces milieux, un certain nombre de substances telles que peptones, phosphates, acides aminés qui jouissent de la propriété d'absorber, de fixer une certaine quantité de l'acide ou de l'alcali ajouté au milieu. L'élément ainsi fixé ne joue plus aucun rôle dans la réaction du liquide et chacune de ces substances que l'on a appelées « tampons », ayant un pouvoir de fixation différent, la méthode titrimétrique indiquera, pour une même quantité d'élément actif libre, des valeurs différentes

(1) C'est-à-dire que les éléments de chaque floculat deviennent dissociables.

d'acidité ou d'alcalinité, suivant la composition du milieu, et les résultats ne seront pas comparables.

Deux méthodes sont à notre disposition pour titrer dans un liquide les éléments acides ou alcalins libres et par conséquent actifs à l'exclusion des éléments fixés par le milieu : la méthode électrométrique et la méthode colorimétrique ; elles sont basées sur la mesure de la concentration des ions hydrogènes libres.

La méthode électrométrique est une méthode d'application délicate, nécessitant un appareillage électrique spécial, mais elle est très exacte et a servi à étalonner les solutions employées par la méthode colorimétrique. Dans la pratique, c'est cette dernière méthode qui est préférée pour déterminer le pH d'un milieu de culture (Sørensen a choisi pour représenter l'acidité ce symbole pH dont les valeurs sont l'inverse des logarithmes des concentrations en ions H).

Grâce aux échelles colorimétriques établies d'avance, il est possible aujourd'hui d'ajuster un milieu de culture à un pH déterminé et d'obtenir ainsi des milieux toujours comparables, ce qui est important au point de vue de l'étude de la biologie des microbes. Car la rapidité et la richesse des cultures, la durée de la vitalité des bactéries, la production de toxines, la virulence sont en rapport avec la réaction du milieu.

Inversement, la destruction des microbes peut s'aider des données de la chimie physique, et il faut faire une mention toute spéciale aux progrès que cette science a fait faire durant ces dernières années à la question des désinfectants, en montrant les relations qui existent entre les propriétés physico-chimiques et les propriétés antiseptiques d'un corps. On pense actuellement que les ions métalliques présents dans la solution aqueuse d'un sel provenant de la dissociation électrolytique sont les principaux agents désinfectants. Nous ne pouvons citer ici que quelques exemples : Maillard a montré que l'action empêchante du sulfate de cuivre sur une culture de *Penicillium* est diminuée par l'addition de sulfate de sodium qui diminue la concentration en ions cuivre. Ch. Krönig et Paul ont montré que l'action désinfectante de quantités équimoléculaires de chlorure mercurique, de bromure mercurique et de cyanure mercurique est fonction de leur dissociation, c'est-à-dire de la concentration en ions de leur solution.

L'expérience suivante de Miss Schick conduit aux mêmes conclusions :

Argent.	Fluorure, forte dissociation.	Deux heures d'action sur des staphylo- coques.	Milieu aqueux, 1/10.000.000.	Sérum, 1/3.000
	Cyanure d'argent et de Na, dissociation faible.		Rapport, 20 à 1.	Rapport, 30 à 1.
			1/5.000	1/100

Sur ces questions, d'intéressants travaux ont été publiés dans ces derniers temps et voici qu'on entre résolument dans l'étude de l'action de certains agents physiques sur les microbes. Dès 1914, M^{me} Victor Henri (1) montrait qu'en faisant agir les rayons ultra-violets sur une émulsion de bactérie charbonneuse, on pouvait, par irradiation ménagée, provoquer chez ce microbe une série de modifications portant sur ses caractères morphologiques et ses propriétés biochimiques. Les modifications étaient profondes puisque l'on pouvait voir les bâtonnets se transformer en diplocoques ou en cocci isolés. Plus récemment, R. Bruynoghe et W. Mund ont étudié l'action du radium sur les microbes (2). Il résulte des expériences de ces auteurs que l'émanation de radium enlève aux microbes leur aptitude culturale, tout en laissant subsister d'autres manifestations de leur vitalité, par exemple la mobilité. F. Arloing, A. Policard et L. Langeron (3) ont montré que, sous l'influence des radiations émises par une lampe à vapeur de mercure munie d'un filtre de Wood à l'oxyde de nickel, certaines cultures microbiennes offrent un aspect tout à fait curieux. MM. A. Lacassagne et A. Paulin (4) ont constaté que le rayonnement α exerce une action bactéricide sur tous les microbes qu'ils ont examinés, mais variable pour chacun d'eux, ce qui a permis de leur assigner un véritable rang de radio-sensibilité. L'action du radium sur les toxines et les sérums n'est pas moins intéressante. En faisant agir l'émanation du radium sur la toxine tétanique, MM. S. Mutermilch et R. Ferroux n'ont pu détruire le groupe toxique sans détruire en même temps le groupe antigène, fait qui est en opposition avec les résultats obtenus lors-

1. *C. R. Acad. des Sciences*, 6 avril et 27 juillet 1914.

2. *C. R. Soc. de Biol.*, 10 janvier 1925.

3. *C. R. Soc. Biol.*, 19 janvier 1920.

4. *C. R. Soc. de Biol.*, 17 janvier 1925.

qu'on traite les toxines à l'aide de certains agents chimiques qui détruisent d'abord le groupe toxique, laissant intactes les propriétés antigènes.

MM. Lacassagne et Paulin (1) ont recherché l'influence des injections de corps radio-actifs sur la fabrication des anticorps qui n'est pas sensiblement modifiée par eux. Les mêmes auteurs (2), étudiant la destruction du principe bactériolytique par les rayonnements corpusculaires du radium, ont obtenu sa destruction, comme on obtient dans les mêmes conditions celles des toxines et des virus filtrables. MM. P. Lasseur, F. Girardet et H. Vermelin ont précisé (3) les conditions d'étude des constantes physico-chimiques des sérums et étudié spécialement les variations de la conductibilité électrique avec la dilution.

J. Cluzet, A. Rochaix et Th. Kofman ont montré les variations du pouvoir agglutinant d'un immunsérum mixte sous l'influence de courant continu (4). R. Bruynoghe (5) s'est attaché à déterminer l'action du radium sur la vaccine.

Le professeur Sanarelli, directeur de l'Institut d'Hygiène de l'Université de Rome, pense que le « galvanotropisme microbien dans l'organisme animal » constitue la raison pour laquelle certains microbes, parmi lesquels les vibrions cholériques, disparaissent presque complètement de la sérosité péritonéale et sont attirés par les membranes séreuses. Les vibrions, doués de signe électrique négatif, sont immédiatement attirés par la surface de l'épiploon qui, normalement, possède une charge électrique positive (6).

Il faut faire une place spéciale aux travaux de MM. P. Girard et E. Peyre sur les « modifications de l'état colloïdal du plasma par certains colorants fluorescents (7) ». Ces auteurs ont étudié les modifications de l'état colloïdal du plasma que provoque l'injection dans la circulation sanguine d'éosinate ou d'érythroéosinate de césium. Cette modification de l'état colloïdal du plasma par certains colorants fluorescents a une heureuse

1. *C. R. Soc. de Biol.*, 6 février 1926.

2. *Soc. anat.*, 3 décembre 1925.

3. *Bul. chim. biol.*, avril 1925.

4. *Acad. des Sciences*, 25 mai 1925.

5. *C. R. Soc. de Biol.*, 24 mars 1925.

6. *Ann. de l'Inst. Pasteur*, février 1926.

7. *C. R. Soc. Biol.*, 12 juin 1926.

influence : la protection vis-à-vis du choc direct (non anaphylactique) et vis-à-vis du choc anaphylactique.

La question des colloïdes a été très étudiée, car elle est aussi intéressante pour le médecin praticien orienté vers des applications thérapeutiques que pour l'homme de laboratoire qui poursuit des recherches théoriques. Auguste Lumière a publié d'importants travaux sur le problème de l'anaphylaxie, le rôle de la floculation dans l'immunité, le mécanisme de la mort subite, pour ne citer que ces questions. Cet auteur résumant son opinion dans un livre intitulé « le rôle des colloïdes chez les êtres vivants » considère l'évolution et la floculation de la micelle colloïdale comme la base de la physiologie normale et pathologique; pour lui : « l'état colloïdal conditionne la vie. La floculation détermine la maladie et la mort ».

Enfin les découvertes faites par les bactériologistes grâce à la chimie physique peuvent avoir une orientation thérapeutique ou prophylactique intéressante. On sait quels importants résultats pratiques ont découlé, par exemple, des recherches de Ramon sur la floculation : titrage de certains sérums thérapeutiques, découverte de l'anatoxine que L. Martin et ses collaborateurs Darré, Loiseau, Laffaille les premiers, quelques auteurs ensuite parmi lesquels il faut d'abord citer Zoeller, ont appliquée à la vaccination antidiptérique.

Enfin il suffit d'ouvrir un livre de Chimie physique et d'étudier la table de Mendéleïeff pour constater qu'à la rencontre de la ligne horizontale (poids atomiques) 6 où figure le mercure et de la ligne verticale (propriétés chimiques très voisines) V où est placé l'arsenic, on trouve précisément le bismuth, ces trois corps constituant les trois médicaments antisyphilitiques actuellement employés.

N'est-il pas suggestif de penser qu'entre le sérum d'un individu sain et celui d'une personne atteinte d'une maladie aussi grave que la syphilis il n'y a, au point de vue qui nous occupe, qu'une différence d'état physico-chimique, différence que révèle un rythme spécial de floculation?

Nous ne pouvons ici multiplier les exemples, mais ils suffiront sans doute à faire comprendre et aimer cette évolution nouvelle de la biologie qui emprunte à la chimie physique l'originalité et la précision de ses méthodes.

Conclusions.

L'addition de résines diverses au complexe « antigène-sérum correspondant » rend la floculation du sérum macroscopique facile à apprécier sans l'aide d'aucun appareil d'optique, ce qui est une grande simplification et met à la disposition des sérologistes une méthode facile à appliquer dans tous les laboratoires. Cette méthode, quoique simple, donne des résultats aussi précis que les procédés plus compliqués comme le prouvent les rapprochements avec la clinique et les essais sérologiques comparatifs que nous avons apportés dans ce travail.

La technique de floculation que nous avons décrite a une portée générale en sérologie. Elle a une application pratique immédiate dans de nombreux cas (floculation des sérums syphilitiques, des sérums antimicrobiens et particulièrement des sérums antiméningococciques). Elle a un intérêt théorique important : elle met en évidence une curieuse propriété physique du sérum sanguin ; elle nous permet de préciser les lois de l'équilibre de certains colloïdes humoraux et de pénétrer plus avant dans l'étude du mécanisme de la floculation des sérums sanguins ; elle permet enfin de mettre en relief l'importance de l'application des méthodes de la chimie physique à l'étude de certains phénomènes biologiques.

MORPHOLOGIE, NATURE ET CYCLE ÉVOLUTIF DU MICROBE DE LA PÉRIPNEUMONIE DES BOVIDÉS

par le prof. Dr JULIEN NOWAK,
Directeur de l'Institut des recherches de pathologie humaine
et vétérinaire de l'Université Jagellon, Cracovie.

Les essais de culture du microbe de la péripneumonie dans les milieux liquides ayant échoué, J. Bordet, qui, le premier, a étudié la morphologie de ce germe, employa un milieu solide, la gélose au sang additionnée d'un peu d'extrait de pommes de terre et de glycérine sur laquelle il obtint un faible développement du microbe.

Il faut admirer Bordet d'avoir pu distinguer dans ses préparations, à côté des globules rouges et des débris de pomme de terre, un microbe aussi minuscule que le parasite de la péripneumonie.

Comme ce microbe traverse les filtres Berkefeld et Chamberland, on était disposé à croire que, du fait de sa petitesse, il ne peut être aperçu à l'examen microscopique et on le comptait parmi les microbes ultra-microscopiques. Cependant la légère opalescence qui apparaît dans les milieux liquides ensemencés permettait d'espérer qu'il serait possible d'observer ce microbe si ténu et si intéressant. Bordet, en effet, a réussi à en obtenir de bonnes préparations qui lui ont permis d'en donner la description suivante : « Le microbe (de la péripneumonie) apparaît comme un filament fin, parfois simplement arqué, parfois en ondulation flexueuse, ou enroulé en S, ou même en spire. On trouve aussi des granulations arrondies dont le centre est généralement moins coloré. » S'agit-il d'un vibron ou d'un spirochète?

Bordet a observé que les filaments ci-dessus décrits présentent des renflements plus ou moins étendus, que leurs extrémités sont souvent effilées et que leur colorabilité n'est pas uniforme. Le microbe lui paraît plus petit que celui de la syphilis.

Dans des milieux liquides convenables, Bordet a obtenu, au

bout d'un ou deux jours, des cultures franchement opalescentes, fourmillant de filaments analogues à ceux obtenus sur la gélose au sang, mais un peu plus trapus et plus aisément colorables; il y trouva même de véritables ramifications. Les formes globuleuses, les granulations à centre clair qu'on trouve dans les premiers stades des cultures deviennent plus nombreuses au fur et à mesure que la culture vieillit, tandis que le nombre des filaments diminue. L'auteur admet que les formes globuleuses dérivent des filaments qui subissent une métamorphose. Le centre des grains est souvent moins coloré que la périphérie, ce qui suggère une analogie avec les granules résultant de la transformation des vibrions cholériques vieillis. Ces formes granuleuses seraient assimilables à des formes de résistance tandis que les filaments représenteraient des formes plus normales.

L'étude du microbe de la péripneumonie fut ensuite reprise par Borrel, Dujardin-Beaumetz, Jeantet et Jouan (1), et les résultats obtenus par ces auteurs ont été publiés dans le même numéro des *Annales de l'Institut Pasteur* que ceux de Bordet. De même que Bordet, ils se servaient, pour colorer les microbes, de la méthode de Giemsa, et surtout de la surcoloration après mordantage (méthode de Loeffler), à quoi ils joignaient *l'examen à l'état frais et l'examen ultra-microscopique*. Après centrifugation des cultures en milieu liquide, le culot obtenu était étalé sur lame et fixé par l'alcool ou par la chaleur. Les auteurs soulignent que l'étude des colonies développées sur les milieux solides leur a paru presque impossible.

A l'examen à l'état frais et à l'ultra-microscope ils ont constaté que le microbe est absolument immobile. Il apparaît sous forme de globules arrondis, ovoïdes, ou sous des formes pseudo-vibrionniennes et filamenteuses. Il est toujours entouré d'une gangue muqueuse très visible après surcoloration. Il peut se diviser dans cette gangue suivant plusieurs directions de l'espace et se présenter ensuite sous forme de diplocoques, d'amas ou de chaînettes dont les individus sont d'inégales dimensions. Chaque unité de ces amas microbiens peut se subdiviser et donner naissance à des formes bifurquées, astéroïdes, bi-

(1) Ces *Annales*, 34, 1910.

polaires, tri-polaires, pseudo-vibronniennes, rappelant certains aspects du microbe des nodosités des légumineuses.

Dans les jeunes cultures — de vingt-quatre heures à quarante-huit heures — on observe surtout des formes en grains, en diplocoques, en anneaux ou en chaînettes. Au troisième et au quatrième jour, la forme pseudo-vibronnienne domine et on trouve des amas de granulations en tétrades, en morulas, des figures en tricorne, en astéroïdes, etc.; qui peuvent bourgeonner et donner naissance à des filaments.

Des formes filamenteuses, souvent ramifiées, apparaissent quelquefois à partir du deuxième jour, mais elles sont beaucoup plus constantes dans les cultures de cinq à six jours. Elles finissent par se réunir bout à bout et par s'agglutiner. Au moyen de l'ultra-microscope on a pu déceler, à l'intérieur des filaments, des granulations en streptocoques qui n'étaient visibles que partiellement après la surcoloration.

Les filaments, très souvent bifurqués, triturqués, astéroïdes, sont par endroits fortement colorés, tandis que leurs autres parties le sont à peine. Borrel et ses collaborateurs expriment l'idée que tous les éléments que l'on observe dans les cultures du microbe de la péripneumonie, ainsi que les formes filamenteuses mycéliennes, résultent de la présence de la gangue visqueuse dont le microbe est toujours entouré.

Dans les vieilles cultures de douze à quinze jours, on ne trouve que des formes d'involution dues à la coalescence des substances muqueuses sécrétées par les microbes âgés.

L'existence de toutes ces formes a été également constatée à l'examen ultra-microscopique.

Les auteurs nient la conception de Bordet que le parasite de la péripneumonie soit un vibron ou un spirille, et ils sont d'avis que le terme : « *Asterococcus mycoides* » par lequel ils désignent ce microbe, qui se distingue surtout par un polymorphisme extraordinaire, rappelle ses caractéristiques principales. Ils pensent que, s'il est le seul connu actuellement de son espèce, on peut prévoir qu'il ne restera pas isolé dans ce groupe.

Il m'a semblé utile de résumer un peu longuement le travail de Bordet, ainsi que celui de Borrel, Dujardin-Beaumetz et leurs collaborateurs, parce qu'ils ont mis nettement en évi-

dence la caractéristique principale de ce microbe : son extrême polymorphisme. Plus que telle ou telle dénomination, ce qui importe dans leurs études c'est la description qu'ils ont donnée avec une exactitude surprenante, immuable, même si nos conceptions sur la nature du parasite de la péripneumonie venaient à se modifier, des différentes formes du microbe qui semble évoluer incessamment entre le domaine des bactéries et celui des *Fongi imperfecti*.

Martzinowski (1) a publié, une année plus tard, le résultat de ses recherches sur la morphologie du virus de la péripneumonie. Partant de ce principe que le microbe subit trop facilement l'involution dans les cultures, il s'est borné à étudier sa morphologie dans les sucs d'organes infectés. Il a observé que le microbe y est immobile, très polymorphe, entouré d'une gangue muqueuse à peine visible et qu'il apparaît sous forme de cocci allongés, isolés ou réunis en diplocoques ou en courtes chaînettes. On trouve aussi des bâtonnets renflés en leur milieu, isolés ou réunis en filaments, de même que des formes vibrionniennes et spirillaires.

L'auteur a comparé les observations faites sur les frottis de l'exsudat pulmonaire avec celles des préparations de cultures du microbe et il en a constaté l'analogie complète, avec cette seule différence que, dans les cultures, l'involution des formes se produit plus rapidement. Il a rangé le microbe de Nocard et Roux dans le groupe des coccobacilles en lui donnant le nom de *Coccobacillus mycoides peripneumoniæ*.

L'étude de ce microbe n'est pas facile parce qu'il est extrêmement petit et qu'il se colore mal. C'est pourquoi les résultats obtenus par Borrel et ses collaborateurs ont été l'objet de contestations. Titze et Seelemann (2) considéraient qu'il est encore douteux que les cultures du microbe, obtenues de produits pathologiques de la péripneumonie, soient réellement l'agent pathogène de cette infection, car il est bien difficile de trouver un rapport logique entre les formes si différentes et si bizarres décrites par les auteurs français.

Freiberger (3) s'est efforcé de contrôler les résultats des

(1) Ces *Annales*, 25, 1911.

(2) *Berliner Tierärztliche Wochenschrift*, 1921, n° 3, p. 20.

(3) *Zeitschrift für Infektionskrankheiten*, 12, p. 453.

auteurs français en examinant à l'ultra-microscope les sérums de divers animaux et il conclut que les petits corpuscules signalés par les auteurs français dans les cultures de la péripneumonie ne représentent rien de spécifique puisqu'on trouve des corpuscules semblables dans le sérum de divers animaux malades ou bien portants.

Titze et Seelemann reconnaissent la présence, dans les cultures en bouillon de péripneumonie, d'un germe spécifique. En inoculant ces cultures à de jeunes bêtes à cornes, ils réussirent à provoquer les mêmes altérations morbides qu'avec le liquide pulmonaire des bovidés morts de péripneumonie. Si ce n'est l'agent pathogène, on a donc affaire au moins aux produits spécifiques de la réaction de l'organisme à l'infection.

Les mêmes auteurs ont étudié le parasite supposé à l'ultra-microscope. Ils n'ont observé que de tout petits corpuscules animés de mouvements browniens et peut-être aussi de véritables mouvements actifs. Ils n'étaient d'ailleurs pas en état d'apercevoir les filaments ni les ramifications qui doivent s'y trouver si le développement du microbe comporte des stades évolutifs. Ils ont trouvé également des formes en anneaux obscurs au centre et brillants à la périphérie.

En contradiction avec les résultats de Freiburger, ils n'ont pu observer, dans les milieux liquides stériles destinés à la culture du microbe de la péripneumonie, ainsi que dans divers sérums, que de petits corpuscules à peine visibles, immobiles, tandis que les corpuscules ci-dessus décrits dans les cultures et caractéristiques de celles-ci y étaient absents.

Ils ont immunisé des animaux par injection intraveineuse de cultures de péripneumonie, et le sérum des animaux ainsi traités montrait des propriétés agglutinantes vis-à-vis du parasite, ce qui prouve que les cultures renferment l'agent spécifique de la maladie.

Ensuite les études sur la morphologie du microbe ont été reprises par Frosch (1) qui, en collaboration avec Loeffler, avait signalé en 1898 que l'agent pathogène spécifique de la fièvre aphteuse est si petit qu'il passe par les filtres Chamberland.

(1) *Archiv für wissenschaftliche und praktische Tierheilkunde*, 49, n° 1-3, 1922.

Frosch a appliqué à ses études le procédé de la microphotographie par les rayons ultra-violets dans l'appareil de Köhler. Mais les reproductions photographiques des préparations microscopiques de cultures en milieu liquide donnant des images presque impossibles à distinguer, Frosch s'est donc borné à photographier, dans la lumière ultra-violette, les colonies de péripneumonie sur la gélose-sérum, c'est-à-dire des tranches microscopiques de ces colonies, et surtout leurs bords.

La technique de la photographie à l'ultra-microscope de Köhler est très compliquée, et Frosch se plaint surtout de l'impossibilité de trouver une position de l'image microscopique qui corresponde à la position de la plaque photographique. Il faut donc opérer au hasard. Ayant surmonté ces difficultés, il a réussi à obtenir à la lumière ultra-violette des images photographiques des colonies de péripneumonie dont il a publié quelques reproductions.

N'oublions pas que la particularité de l'appareil de Köhler est non pas d'augmenter le grossissement de l'image des objets photographiés par le procédé ordinaire, mais d'accroître, par l'application des ondes les plus courtes de la lumière, l'ouverture numérique de l'objectif à immersion et, par ce fait même, d'augmenter le pouvoir résolvant de l'objectif. Or, ce pouvoir, dans l'appareil de Köhler, est de plus du double de celui des objectifs ordinaires, même les meilleurs que l'on emploie dans la microphotographie ordinaire. Cependant les résultats que Frosch a obtenus par ce procédé sont peu satisfaisants.

En résumé, Frosch constate que les colonies consistent en de très petits corpuscules qui ne sont pas ultra-microscopiques au vrai sens du mot, différent de ceux décrits par Bordet et par Borrel, Dujardin-Beaumetz et leurs collaborateurs, et se rapprochent des formes observées par Martzinowski dans le liquide pulmonaire des animaux morts de péripneumonie.

Il considère les corpuscules comme le véritable agent de la péripneumonie, mais il laisse sa nature incertaine et admet qu'il peut s'agir aussi bien d'une bactérie que d'une levure ou même d'un champignon.

Dans son second mémoire (1), Frosch relate que, pour pré-

(1) *Archiv für wissenschaftliche und praktische Tierheilkunde*, 49, n° 6, 1923.

ciser la nature des corpuscules élémentaires dont il a constaté la présence dans les colonies sur gélose-sérum il a étudié les cultures en milieu liquide. Il a examiné le dépôt qu'il obtenait par la centrifugation de ces cultures et il a pu constater que, comme dans les colonies sur gélose-sérum, les corpuscules élémentaires sont de grandeurs variables et de forme ronde, ovale ou polygonale. Il a distingué de petits corpuscules de forme annulaire, de grandes formes à double contour et des plaques uniformes et concaves au centre. Parmi les corpuscules à double contour, il en est qui renferment à leur intérieur un petit corpuscule punctiforme. On trouve aussi des corpuscules semblables, libres, dans le champ du microscope. L'auteur est d'avis que toutes ces formes ont une grande ressemblance avec les conidies des champignons à mycélium et surtout avec les cellules des levures. Cette dernière impression est encore renforcée par l'observation de figures de multiplication par bourgeonnement.

Dans les cultures en milieu liquide, Frosch a observé, en outre, des corpuscules analogues à ceux des colonies sur gélose-sérum, et des filaments fins qu'on peut considérer comme un mycélium; mais il souligne qu'il n'a jamais pu constater par la photographie de relations entre les corpuscules primitifs et les filaments. La présence des filaments n'autorise pas à rejeter le caractère de levures des corpuscules primitifs, car de tels filaments apparaissent aussi dans de vieilles cultures de levures. Dans les colonies sur milieux solides, Frosch n'a pas observé de filaments.

Les corpuscules primitifs peuvent être observés au microscope; ils ne sont donc pas ultra-microscopiques, mais on les décèle incomparablement mieux à l'ultra-microscope.

En se fondant sur les observations rapportées plus haut, Frosch désigne le microbe de la péripneumonie sous le nom de « *Mycromyces peripneumonix bovis contagiosæ* ». Mais son mode d'observation étant tout à fait différent, il n'est pas en mesure de préciser l'analogie qui peut exister entre ces corpuscules primitifs et les formes décrites par Dujardin-Beaumetz et par Bordet. A son avis, les formes décrites par les auteurs français (formes filamenteuses, cunéiformes, spirillaires, en partie même ramifiées, etc.), apparaissent douteuses et peuvent

être considérées comme des éléments du milieu nutritif modifié par le microbe de la péripneumonie. Frosch a observé lui-même des modifications analogues dans des colonies du microbe sur gélose-sérum. Dans le liquide pulmonaire d'une bête à cornes morte de péripneumonie, il a constaté les mêmes corpuscules primitifs que dans ses cultures.

Les photographies faites à l'ultra-microscope de Köhler, publiées par Frosch, quoique meilleures que celles du travail précédent, ne donnent qu'une idée insuffisante de ses observations, et on acquiert la conviction que ce procédé d'étude d'un microbe tel que celui de la péripneumonie, encore si peu connu, est loin de posséder les qualités requises. En étudiant ces images, il est très difficile d'y trouver une base pour la conception de Frosch que le microbe de la péripneumonie doit être une espèce particulière de levure, et on est plutôt amené à croire qu'il voyait peut-être sur ses plaques photographiques plus qu'il n'a donné dans ses reproductions.

Bechhold et Sierakowski (1), en présence du fait qu'on ne peut presque rien discerner dans les préparations des cultures de la péripneumonie par l'examen microscopique, même après coloration, ont eu recours à la méthode adoptée pour la première fois en 1925 par Bechhold et Villa et qui consiste à augmenter le volume des corpuscules dits ultra-microscopiques par imprégnation d'or.

Dans ce but, ils traitent les cultures de la péripneumonie avec du chlorure d'or, les lavent à l'ultra-filtre, puis les réduisent en cendres. Après renforcement par une solution spéciale, on peut distinguer au microscope de très petits points noirs, et, sur le fond noir, des corpuscules très brillants.

Les auteurs remarquent que les formes ainsi observées étaient identiques à celles photographiées par Frosch dans la lumière ultra-violette et décrites par lui.

Selon Bechhold et Sierakowski, le microbe de la péripneumonie doit son invisibilité aux conditions de la réfraction optique, qui empêchent de le voir au microscope, bien plus qu'à sa petitesse.

En 1927, Orskow a publié les résultats de ses observations

(1) *Zeitschrift für Hygiene und Infektionskrankheiten*, 106, 1926, p. 580.

microscopiques des colonies du microbe de la péri-pneumonie sur gélose-sérum en goutte pendante. Il a constaté que la forme élémentaire de ce virus est un petit corps ovale ou un bâtonnet court, qui germe en un mycélium ramifié. Celui-ci est d'aspect homogène ou montre des parties fortement réfringentes, souvent en séries. Certaines colonies très jeunes ne sont composées que de filaments mycéliens et, au fur et à mesure que la colonie devient plus âgée, il s'y produit davantage de formes rondes et irrégulières; finalement on ne trouve plus que ces éléments, morphologiquement très variables, et qui, en général, ne possèdent plus la faculté de germination.

Orskow ne s'occupe pas de déterminer la position systématique du virus.

J'ai considéré comme nécessaire de faire cette revue des travaux sur la morphologie et la nature du microbe de la péri-pneumonie, parce que celui-ci est encore très peu connu malgré les recherches multiples dont il a été l'objet. Il en résulte que ce microbe, quoique très petit, n'est pas ultra-microscopique puisqu'il peut être observé tantôt sur des préparations colorées, tantôt au moyen de la microphotographie. Les observations faites sont cependant insuffisantes pour donner une idée exacte de sa morphologie et, en outre, elles diffèrent entre elles.

Borrel, Dujardin-Beaumetz et leurs collaborateurs, d'une part, Frosch et Orskow d'autre part, sont d'accord sur la nature mycélienne du microbe. Frosch se croit même autorisé à insister sur ses affinités étroites avec les levures. Presque tous les observateurs qui l'ont étudié tombent d'accord sur ce point qu'il a une morphologie particulière et que les formes qu'il prend dans les cultures sont d'une instabilité extrême puisqu'elles peuvent changer d'une minute à l'autre ainsi qu'Orskow l'a observé.

La cause pour laquelle ce microbe si intéressant n'est pas encore suffisamment connu est certainement sa petitesse et, plus encore, ses conditions de réfraction optique, dont font mention Bechhold et Sierakowski. Avant tout, c'est cependant sa résistance extrême à la coloration. Les recherches à son sujet sont actuellement facilitées par la simplification des méthodes de cultures artificielles, mais, pour le mieux con-

naître, il faut s'efforcer d'obtenir des préparations bien colorées. C'est ce que mes collaborateurs et moi nous avons tout d'abord essayé d'obtenir.

Je me suis servi dans mes recherches de plusieurs souches, dont une provenait de l'Institut Pasteur de Paris. J'ai bientôt acquis la conviction que la seule méthode de coloration pouvant fournir des résultats satisfaisants est celle que Loeffler a employée pour la coloration des cils bactériens, à la condition de renforcer l'action du colorant et celle du mordantage. Avant tout il faut prendre soin de tenir dans un état de propreté minutieuse les lames dont on se sert pour les préparations. Le liquide de Giemsa, ainsi que les autres colorants et les divers autres procédés de coloration, ne sont pas propres à rendre visible le microbe de la péripneumonie car ils le teignent trop faiblement.

Les cultures à examiner sont, comme il est de règle, centrifugées, et le culot minuscule obtenu est étalé sur des lames de verre, fixé et coloré. Il n'est pas absolument nécessaire de laver le culot, mais il convient cependant de l'agiter dans un peu de liquide.

Non seulement le microbe de la péripneumonie résiste à la coloration, mais, une fois coloré, il perd facilement sa couleur. Il suffit quelquefois de laver au xylol une préparation bien colorée pour qu'elle se décolore. Une coloration énergique selon la méthode de Loeffler produit des précipités, ce qui rend son emploi assez délicat.

J'ai également utilisé dans mes recherches la microphotographie, procédé très utile non seulement pour conserver et fixer les images, mais aussi pour dévoiler les détails invisibles à l'examen microscopique ordinaire.

Les résultats publiés dans ce mémoire ne se rapportent qu'à des cultures en milieu liquide, plus favorables à l'étude morphologique du microbe que les cultures sur milieu solide. La morphologie du parasite dans des cultures sur milieu solide sera l'objet d'un travail ultérieur.

Les microphotographies sont faites avec un grossissement de 3.000 à l'objectif à immersion de Zeiss (ouverture numérique : 1.40 et distance focale : 2 millimètres). Les photographies sont telles qu'elles sont obtenues sur les plaques sans agrandissement ultérieur ni retouche.

Le point de départ de nos études est la photographie d'une préparation de culture en bouillon-sérum de trois semaines (planche 1, figure 1). Nous y observons des corpuscules assez volumineux, d'une forme irrégulière, fortement colorés. A côté d'eux, des corpuscules, ou des globules, plus petits que les précédents, de forme ronde, ovale ou irrégulière et peu colorés. C'est avec cette culture, dont une préparation est représentée figure 1, qu'a étéensemencé un milieu liquide convenable. La figure 2 représente le dépôt obtenu par centrifugation de ce milieu nutritif après vingt-quatre heures de séjour à l'étuve.

On y observe une image semblable à celle de la figure 1, à cette différence près que la coloration des petits corpuscules est ici encore plus faible. Ces corpuscules sont entourés d'un mince halo clair, d'une gangue qu'on n'observe que sur certaines préparations, c'est-à-dire sur quelques-unes des formes du parasite.

En examinant les petits corpuscules de ces deux figures et en les comparant aux images que donnent au microscope certaines bactéries (cocci), nous remarquons une différence légère, mais nette. Alors que les cocci donnent l'impression de vrais globules, d'une consistance et d'une forme solides, nos corpuscules semblent plutôt être des gouttelettes d'un liquide épais, du protoplasme non encore consolidé et stabilisé.

La figure 3 (quarante-huit heures) nous montre un de ces corpuscules (peut-être une gouttelette de protoplasme à peine colorée) entouré de quelques grains très petits, fortement colorés, disséminés dans cet amas protoplasmique et saillants. Il s'agit certainement ici d'un processus de bourgeonnement. Un petit corpuscule de la figure 1, ensemencé dans du bouillon-sérum, a germé après un séjour de quarante-huit heures à l'étuve et a donné naissance à de tout petits grains très colorés (bourgeons).

En général, on n'observe le bourgeonnement que chez les corpuscules faiblement colorés, mais la figure 9 est la preuve que des corpuscules fortement colorés bourgeonnent aussi quoique rarement et d'une manière particulière, qui rappellent plutôt le bourgeonnement des spores bactériennes.

Le processus de bourgeonnement apparaît également dans

les figures 4, 5, 6 et 7 (quarante-huit heures), mais les bourgeons sont ici déjà plus grands, plus longs; ils sont en voie de croissance. La figure 6 surtout est intéressante : un corpuscule pousse quatre bourgeons, dont trois petits à peine germés, tandis que le quatrième est devenu déjà assez long, presque un filament.

Les corpuscules qui émettent ces petits bourgeons sont-ils des levures en voie de germination, comme l'admet Frosch? Peut-être! Mais l'analogie est bien lointaine. Nos photographies rappellent plutôt les petites têtes d'*Aspergillus* au début de la germination des conidies, alors qu'elles sont couvertes de stérigmates.

En me basant sur les observations des préparations microscopiques et des images obtenues par la microphotographie, je ne puis définir les corpuscules dont il s'agit que comme des amas protoplasmiques d'une nature indéterminée, et qui germent comme des conidies. Cette conception est d'autant plus vraisemblable que nous pouvons observer sur les figures 6, 7, 8, 10, 11, 12, 17, 18, etc. (quarante-huit heures) la façon dont les petits bourgeons se transforment en filaments mycéliens.

Pour plus de clarté, il faut nécessairement préciser les détails morphologiques de notre microbe. Appelons donc les petits corpuscules protoplasmiques possédant la particularité d'émettre des germes : *corpuscules élémentaires* (1); et les germes eux-mêmes : *corpuscules conidiens*. Les corpuscules conidiens ont végété, en général, dans des conditions favorables au bout de quarante-huit heures environ.

Sur la figure 7, nous observons un corpuscule élémentaire en germination, dont les bourgeons sont devenus déjà de petits filaments mycéliens : le corpuscule lui-même, dont le protoplasme est épuisé par le bourgeonnement, s'est amoindri, mais est encore bien visible, tandis que le corpuscule de la figure 7 est déjà à peine visible et présente un tout petit point clair au lieu des ramifications du mycélium. Sur la figure 10, il n'y a plus trace du corpuscule élémentaire qui a donné naissance à cette petite branche mycélienne; tout le protoplasme du cor-

(1) Je me sers de ce terme dans un sens tout à fait différent de celui employé par les auteurs allemands pour définir certains stades du développement du virus supposé de la variole-vaccine.

puscule est employé à la formation du mycélium. Un stade encore plus avancé du développement de la forme mycélienne du parasite de la péripneumonie nous apparaît dans la figure 21 (quarante-huit heures). C'est déjà un vrai mycélium ramifié. A l'intérieur des filaments mycéliens il y a de petits corpuscules ronds ou ovales, très colorés. Ils sont encore plus marqués sur la figure 16. Que signifient-ils, quel rôle jouent-ils dans le cycle évolutif du microbe étudié? On ne peut guère répondre à cette question que par hypothèse. Certes, ces petits *corpuscules endomycéliens* ne jouent pas le rôle que leur attribuent Borrel, Dujardin-Beaumetz et leurs collaborateurs; ils ne représentent pas des unités microbiennes au sens de ces auteurs qui admettaient que le polymorphisme du microbe de la péripneumonie doit son origine à une formation microbienne très petite, entourée d'une gangue muqueuse à l'intérieur de laquelle elle se divise suivant différentes directions de l'espace, en donnant naissance à des formes mycéliennes, à des ramifications, à des formes bifurquées, à des formes astéroïdes, etc. Or, mes recherches m'ont démontré que les filaments richement ramifiés qu'on observe à un des stades du cycle évolutif du microbe est un vrai mycélium qui semble être entouré d'une couche très fine de gangue muqueuse dont le rôle dans le développement du parasite apparaît secondaire.

Les formes astéroïdes décrites surtout par les auteurs français sont expliquées par les figures 7, 8, 11, 17, 18, 20; elles ne sont pas autre chose que les corpuscules élémentaires en germination.

Comme Orskow l'a observé dans les cultures sur milieu solide, les filaments mycéliens atteignent parfois des dimensions considérables, comme le montre la figure 30 (quarante-huit heures). C'est une longue branche mycélienne avec plusieurs petites ramifications qui, à leurs extrémités, portent de petits renflements ronds ou ovales, des petits corpuscules très colorés. Il y a également de ces corpuscules à l'intérieur du mycélium. Nous les avons appelés *corpuscules endomycéliens* et nous avons déclaré notre ignorance quant à leur rôle dans le développement du parasite.

Les petits corpuscules se colorent fortement et, comme nous le verrons plus loin, les filaments mycéliens se différencient bientôt après leur naissance en se colorant fortement dans cer-

taines parties, faiblement en d'autres. Les corpuscules endomycéliens très colorés ne sont peut-être que le commencement de cette différenciation.

A côté des filaments mycéliens ramifiés, on en trouve d'autres sans ramifications, en forme de vibrions, de spiroosomes, d'enroulements, etc..., comme le montrent les figures 27, 31 (quatre jours). La différenciation du mycélium en parties colorées plus fortement et en parties d'une coloration plus faible est déjà marquée sur la figure 31.

Le parasite de la péripneumonie est un microbe d'une morphologie singulière. Comment s'expliquer par exemple la figure 28 (quatre jours)? Un filament assez volumineux porte à son centre un renflement arrondi et à ses deux extrémités deux corpuscules élémentaires en germination : les petits germes très colorés, les corpuscules maternels à peine colorés. La seule explication possible dans l'état actuel de nos connaissances est que les deux bourgeons de deux corpuscules élémentaires voisins se sont développés vigoureusement, se sont rencontrés et se sont unis au point de renflement situé au milieu du filament. Les deux petits bourgeons sur les deux corpuscules se sont développés un peu plus tard; ils sont plus jeunes que le premier; mais ce n'est là qu'une hypothèse.

Une forme curieuse du parasite de la péripneumonie que nous connaissons déjà par la littérature est la forme en anneau. La figure 26 nous montre une de ces formes annulaires. C'est manifestement un corpuscule arrondi, coloré à la périphérie, et resté clair au centre. Les formes annulaires libres sont assez rares; on les trouve plutôt avec les filaments mycéliens, comme par exemple sur la figure 22 (quatre jours). Aux deux extrémités d'un filament mycélien se trouvent deux corpuscules annulaires, chacun portant un bourgeon allongé en un court filament. Nous observons des images analogues sur la figure 23 (quatre jours) et il vient instinctivement à l'esprit la comparaison avec les chlamydospores des champignons mycéliens. Mais il faut se rendre compte que nous sommes habitués à penser par schémas morphologiques construits pour des êtres d'un ordre plus élevé, et bien étudiés, schémas qu'on ne peut appliquer à des éléments si petits et si peu connus que le parasite de la péripneumonie.

Sur la figure 25, on voit un globule annulaire à l'extrémité d'un court filament. La périphérie colorée de ce globule présente de petits renflements rappelant le premier stade de la germination.

Les filaments mycéliens apparaissent déjà dans les cultures de quarante-huit heures, comme, par exemple, dans la figure 30; mais, en général, ils ne se montrent en grande quantité que le quatrième jour, où ils sont presque les seules formes du microbe. Les éléments mycéliens sont le plus souvent ramifiés, et souvent très abondamment, même lorsqu'ils sont encore très jeunes (exemple de la figure 40).

Sur la figure 35 nous observons une tresse de filaments mycéliens, une vraie colonie mycélienne, qui flottait dans le liquide de la culture et qui, au premier coup d'œil, rappelle une toute jeune colonie d'actinomyces, avec cette différence pourtant qu'elle nous apparaît agrandie 3.000 fois.

Au quatrième jour, la culture du microbe de la péripneumonie fourmille de filaments mycéliens abondamment ramifiés, quelquefois sous une forme dentritique, comme par exemple sur la figure 33. Sur les préparations on observe les ramifications les plus fantastiques, les ondulations flexueuses les plus bizarres comme on peut le voir sur les figures 29 à 42 du tableau I, et 1 à 6 du tableau II.

Ce qui frappe à côté de l'étonnante richesse des ramifications mycéliennes, c'est une inégalité extraordinaire dans la coloration des différentes parties du réseau mycélien. Cette irrégularité de la coloration du mycélium apparaît surtout considérable dans les préparations de cultures un peu âgées, par exemple dans celles du quatrième jour (fig. 36, 37, 42, tableau I), tandis que le mycélium des cultures plus jeunes, de quarante-huit heures par exemple (fig. 30, 32, tableau I) se colore plus uniformément, quoique cette règle ne soit pas absolue.

La question se pose de savoir quelle est la cause de cette différence dans le pouvoir d'absorption des colorants par les diverses parties du mycélium. Est-ce le signe du vieillissement de la culture, d'une dégénérescence partielle du microbe dans sa forme mycélienne?

Nous sommes habitués à considérer les éléments cellulaires et les microbes qui ne se colorent pas ou qui se colorent mal

comme anormaux, comme atteints de dégénérescence, morts, ou proches de la mort en raison de leur vieillesse ou pour une toute autre cause. La preuve manque que cette explication s'applique à notre microbe. Chez les bactéries, ce sont justement les formes possédant la plus grande vitalité, les spores, qui se colorent le plus difficilement. Nous avons observé que les corpuscules élémentaires du microbe de la péripneumonie en germination ne sont colorés que faiblement et que les globules très colorés germent rarement. Nous ne pouvons que constater cette différence dans la coloration des diverses parties du réseau mycélien sans en tirer de conclusions.

Quelques images donnent l'impression que les filaments mycéliens mal colorés se fondent et se changent en une matière ne prenant plus ou prenant très mal les colorants (fig. 37, tableau I).

Les parties plus fortement colorées du mycélium sont, en général, un peu plus grosses et on a l'impression que ces parties se condensent, se consolident peu à peu, forment des amas, des masses sphériques d'un volume plus ou moins grand, restant souvent en liaison avec le réseau mycélien dont ils proviennent, comme par exemple sur la figure 4 du tableau II où ils semblent être suspendus aux filaments du mycélium. Les figures 4 et 6 du tableau II (quatre jours) nous présentent de telles images, tandis que sur la figure 5 nous observons, à côté des filaments fortement colorés, des amas du même genre qui ne sont plus reliés au mycélium.

Les figures 14 et 15, tableau II (quatre jours) nous montrent des amas protoplasmiques libres, sous la forme de sphères très colorées. Ils semblent être entourés d'une gangue incolore.

En général, à partir du quatrième jour de la culture, on observe cette transformation du réseau mycélien, et le cinquième et surtout le sixième jour, les filaments mycéliens ont disparu; ils se sont décomposés en fragments (fig. 7, 9, 10, 11, tableau II, cinq-six jours) fortement colorés avec des débris mycéliens faiblement teintés. Ces fragments mycéliens sont-ils des boutures du parasite? Ou traduisent-ils la dégénérescence des formes filamenteuses consécutive au vieillissement du microbe? Elles subissent, au fur et à mesure que la culture devient plus âgée, une transformation dans laquelle elles

s'approchent toujours davantage des formes en amas plus ou moins fortement colorés, et des petits globules.

Les cultures âgées de deux à trois semaines ne contiennent que des grumeaux protoplasmiques d'un volume et d'une forme variés (fig. 13 et 17, tableau II, dix-sept jours). Les figures 12, 18 et 19 (cultures de trois semaines) nous présentent des images analogues, à cette différence près qu'on trouve, à côté des amas et des grumeaux d'un volume relativement assez grand et de formes diverses, de petits globules faiblement colorés. Ce sont les mêmes globules que l'on observe sur la figure 1, tableau I, et qui, ensemencés dans le bouillon-sérum, ont germé au bout de quarante-huit heures (fig. 3-18, tableau I). Les globules font ici, comme ceux de la planche I, l'impression d'être de petits amas protoplasmiques plus comparables à des gouttelettes d'un liquide épais qu'à des formes solides, telles que les bactéries.

Nous trouvons les mêmes globules sur des préparations faites avec du filtrat centrifugé de cultures de plusieurs jours (fig. 16 et 19, p. II). La particularité la plus remarquable du microbe de la péripneumonie est, en effet, sa filtrabilité à travers les filtres en porcelaine ou en terre d'infusoires. Sur les figures 16 et 20, planche II, nous observons des formes qui traversent les parois des filtres. Ce sont des petits globules, des petits corpuscules ronds ou ovales, d'une coloration, en général, faible. Ces corpuscules ont le même aspect microscopique que ceux des figures 12, 18 et 19, c'est-à-dire qu'ils ressemblent à des petits amas de protoplasme d'une consistance uniforme, à demi liquide. Grâce à cette plasticité, ils peuvent s'insinuer dans les parois des filtres et les traverser. Leur petitesse facilite évidemment cette action, mais la possibilité qu'ils ont de s'adapter aux petits canaux et aux petites fentes de la paroi des filtres joue ici peut-être le plus grand rôle.

Il est difficile de dire si les corpuscules colorés faiblement proviennent des filaments d'une faible coloration. Peut-être les amas protoplasmiques colorés fortement, en changeant de nature, perdent-ils en même temps, au moins en partie, la propriété d'absorber les colorants? Il n'est pas impossible non plus que la colorabilité de ces éléments n'ait pas l'importance que nous sommes disposés à lui attribuer. Quoi qu'il en soit, les

corpuscules élémentaires, surtout à la phase de germination, ne montrent qu'une coloration faible.

Lorsqu'on ensemence un filtrat ne contenant que ces petits corpuscules dans un milieu convenable, dans le bouillon-sérum, on obtient une culture dans laquelle on trouve, au bout de quarante-huit heures, des corpuscules élémentaires en germination : au bout de quatre jours, des filaments mycéliens richement ramifiés qui se transforment lentement pour devenir enfin de petits corpuscules : les corpuscules élémentaires. Donc, le point de départ de la culture du microbe de la péri-pneumonie, de même que le terme de son développement, est un tout petit amas protoplasmique, le *corpuscule élémentaire*. Celui-ci, en germant, donne naissance à de petits bourgeons ; à leur tour, ces bourgeons se développent en mycélium richement ramifié qui, en se fragmentant, se transforme finalement en corpuscules élémentaires.

Ce schéma du cycle évolutif du parasite de la péri-pneumonie est très simplifié, car il n'intéresse que les stades les plus marqués de son développement. Bien des choses restent à expliquer, ne fût-ce que les formes en anneau et les petits grains endomycéliens.

Comme l'ont dit Borrel, Dujardin-Beaumetz, etc., le microbe de la péri-pneumonie est le seul de ce genre, mais il se peut que d'autres microbes ultramicroscopiques, c'est-à-dire les virus filtrables que nous ne connaissons pas encore, soient d'une nature analogue. Et notre microbe servira peut-être de clef pour ouvrir des portes encore fermées à la science.

CONCLUSIONS.

1° Le microbe de la péri-pneumonie traverse les filtres Chamberland et les filtres Berkefeld non perméables aux bactéries, mais il n'est pas ultramicroscopique puisque, coloré, il peut être observé par les moyens ordinaires au microscope ;

2° Quand il n'est pas coloré, il n'est pas visible à cause des conditions de sa réfraction optique ;

3° Le microbe est très résistant aux matières colorantes et il ne peut être coloré qu'au moyen des méthodes les plus puissantes ;

4° Le microbe accomplit son cycle évolutif dans les cultures en milieu liquide en peu de jours. Au début, il apparaît comme un petit amas de protoplasme : le *corpuscule élémentaire*, qui forme des bourgeons;

5° Les bourgeons s'allongent bientôt en filaments mycéliens ramifiés, de formes fantastiques et bizarres;

6° Dans les stades récents du développement du mycélium, on observe à son intérieur de petits grains fortement colorés, dont la nature n'est pas élucidée. De même on trouve, avec les filaments mycéliens, des corpuscules en anneau, dont le rôle et la nature ne sont pas davantage connus;

7° Les filaments mycéliens se colorent en partie fortement et en partie faiblement; les parties très colorées se fusionnent partiellement et forment des amas et des boules;

8° Le réseau mycélien se décompose bientôt en fragments et subit une transformation qui aboutit à la formation de petits globules : *corpuscules élémentaires* qui germent à leur tour en bourgeons;

9° Les corpuscules élémentaires qui ne sont colorés, en général, que faiblement semblent être doués d'une grande plasticité qui leur permet de traverser les parois des filtres;

10° Les corpuscules élémentaires ensemencés dans un milieu liquide convenable germent en quarante-huit heures; à ce moment apparaissent déjà de rares filaments mycéliens. Dans les quarante-huit heures qui suivent s'opère la transformation totale du microbe en mycélium;

11° Au bout de cinq à six jours, les filaments mycéliens se décomposent en fragments, qui forment de petits amas protoplasmiques et des globules se colorant tantôt faiblement, tantôt fortement. Les petits globules, en général plus faiblement colorés, sont les corpuscules élémentaires qui traversent les parois des bougies filtrantes;

12° Le microbe semble, au moins à certains stades de son cycle évolutif, n'être qu'un petit amas de protoplasme à demi liquide, épais, d'une consistance homogène; il n'est donc pas différencié en exoplasme et endoplasme. Cette circonstance semble faciliter son polymorphisme;

13° Il n'apparaît pas clairement qu'il existe une différence biologique entre les éléments et les parties des éléments du

microbe colorés faiblement et ceux qui sont colorés fortement, ni qu'elle ait une importance;

14° Le terme *Mycoplasma peripneumoniæ* semble répondre le mieux à la nature et à la morphologie du microbe.

EXPLICATION DES PLANCHES

PLANCHE XX.

- FIG. 1. — Centrifugat d'une culture de trois semaines en bouillon-sérum. Amas protoplasmique fortement coloré et petits corpuscules d'une coloration faible : *corpuscules élémentaires*.
- FIG. 2. — Dépôt resté après centrifugation d'un filtrat d'une culture de quelques semaines. *Corpuscules élémentaires*.
- FIG. 3. — Corpuscules élémentaires germant en bourgeons. Culture de quarante-huit heures.
- FIG. 4. — Même image que la précédente. Quarante-huit heures.
- FIG. 5. — Image analogue. Quarante-huit heures.
- FIG. 6. — Image analogue, mais les bourgeons, surtout l'un d'eux, sont devenus plus longs. Quarante-huit heures.
- FIG. 7. — Bourgeons d'un corpuscule germant qui sont devenus plus longs; ils se présentent déjà comme des petits filaments. Quarante-huit heures.
- FIG. 8. — Image analogue. Quarante-huit heures.
- FIG. 9. — Petit amas protoplasmique fortement coloré, en germination. Quarante-huit heures.
- FIG. 10. — Corpuscule élémentaire ayant germé; les bourgeons sont devenus des petits filaments et le corpuscule a presque disparu. Quarante-huit heures.
- FIG. 11. — Le corpuscule élémentaire a totalement disparu et il n'est resté que des bourgeons transformés en filaments mycéliens. Quarante-huit heures.
- FIG. 12. — Corpuscules élémentaires en germination. Quarante-huit heures.
- FIG. 13. — Corpuscules élémentaires en germination; le processus de bourgeonnement est très distinct. Quarante-huit heures.
- FIG. 14. — Même image. Quarante-huit heures.

FIG. 15. — Même image. Quarante-huit heures.

FIG. 16. — Deux corpuscules élémentaires en germination. L'un d'eux a déjà disparu. A l'intérieur des filaments mycéliens produits par les corpuscules on observe des grains, de petits globules fortement colorés : des *corpuscules endomycéliens*. Quarante-huit heures.

FIG. 17. — Deux corpuscules élémentaires en germination. Quarante-huit heures.

FIG. 18. — Corpuscules élémentaires en germination et petit mycélium, produit de la germination. Quarante-huit heures.

FIG. 19. — Corpuscules élémentaires germant. Un des bourgeons semble devenu déjà un filament mycélien. L'autre image est peut-être le processus de bourgeonnement d'un corpuscule très coloré, analogue à celui de la figure 9. Quarante-huit heures.]

FIG. 20. — Deux corpuscules élémentaires en germination; l'un d'eux est encore bien visible. Les bourgeons sont devenus des filaments mycéliens dont l'un unit les deux centres de la germination. Quatre jours.

FIG. 21. — Petit mycélium faisant suite à la germination. A l'intérieur des filaments mycéliens, il y a de petits corpuscules endomycéliens. Quarante-huit heures.

FIG. 22. — Deux corpuscules en anneau unis par un filament mycélien et comme y poussant des petits filaments. Quatre jours.

FIG. 23. — Filaments mycéliens ramifiés avec des corpuscules en anneau. Quatre jours.

FIG. 24. — Petit mycélium ramifié, en partie renflé, et très coloré. Quatre jours.

FIG. 25. — Corpuscule en anneau avec un petit filament mycélien. La périphérie colorée du corpuscule montre de petits renflements. Quatre jours.

FIG. 26. — Corpuscule en anneau libre. Quatre jours.

FIG. 27. — Filament mycélien rappelant un spirosome. Quatre jours.

FIG. 28. — Deux corpuscules élémentaires en germination unis par un gros filament mycélien avec un renflement au centre. Quatre jours.

FIG. 29. — Réseau mycélien avec des parties rappelant les corpuscules élémentaires germant et les corpuscules en anneau. Les filaments mycéliens sont assez uniformément colorés. Quatre jours.

FIG. 30. — Long filament mycélien avec de petites ramifications simples. Le mycélium est uniformément coloré; à son intérieur il y a des petits grains fort colorés, surtout aux extrémités des ramifications : des *corpuscules endomycéliens*. Quarante-huit heures.

- FIG. 31. — Petits filaments mycéliens solitaires, rappelant des spirosores. Quatre jours.
- FIG. 32. — Petit réseau mycélien fortement coloré. Quarante-huit heures.
- FIG. 33. — Mycélium d'une ramification dentritique. Quatre jours.
- FIG. 34. — Mycéliums ramifiés, colorés en partie fortement et en partie faiblement. Quatre jours.
- FIG. 35. — Réseau mycélien qu'on peut considérer comme une petite colonie mycélienne du microbe, petit thalle. Quatre jours.
- FIG. 36. — Mycélium ramifié d'une coloration inégale, en partie faible et en partie forte. Les parties fortement colorées sont plus grosses. Quatre jours.
- FIG. 37. — Réseau mycélien très faiblement coloré, à l'exception d'une partie épaisse qui montre une coloration forte. Les filaments faiblement colorés semblent se confondre et apparaissent comme une masse amorphe. Quatre jours.
- FIG. 38. — Mycélium fortement coloré. Quatre jours.
- FIG. 39. — Réseau mycélien en partie fortement, en partie faiblement coloré, avec des amas protoplasmiques plus gros et d'une coloration intense. Quatre jours.
- FIG. 40. — Petits filaments mycéliens ramifiés. Il n'y a que quelques parties du mycélium qui sont colorées fortement. Quatre jours.
- FIG. 41. — Image analogue à celle de la figure 37. Quatre jours.
- FIG. 42. — Mycéliums richement ramifiés, en partie fortement, en partie faiblement colorés. Quatre jours.

PLANCHE XXI.

- FIG. 1. — Réseau mycélien. Les parties fortement colorées sont plus grosses. Quatre jours.
- FIG. 2. — Mycélium ramifié avec un corpuscule en anneau. Quarante-huit heures.
- FIG. 3. — Mycélium ramifié en apparencé avec corpuscule en anneau. On y observe, comme sur la plus grande partie des figures précédentes, autour des filaments mycéliens, une gangue incolore. Quatre jours.
- FIG. 4. — Mycélium ramifié, transformé en partie en amas protoplasmiques fortement colorés, dont quelques-uns semblent être suspendus à des filaments mycéliens. Quatre jours.

- FIG. 5. — Filaments mycéliens ramifiés, décomposés partiellement en petits amas protoplasmiques fortement colorés. Quatre jours.
- FIG. 6. — Filaments mycéliens se consolidant en amas protoplasmiques fortement colorés. Quatre jours.
- FIG. 7. — Filaments mycéliens tout à fait décomposés en fragments fortement colorés. On y observe aussi des débris colorés faiblement. Cinq jours.
- FIG. 8. — Filaments mycéliens en voie de consolidation en amas fortement colorés. Quatre jours.
- FIG. 9. — Mycélium décomposé en fragments déjà transformés en amas protoplasmiques. Six jours.
- FIG. 10. — Mycélium décomposé en fragments qui rappellent parfois les formes des bactéries des légumineuses. Six jours.
- FIG. 11. — Exemple de transformation du mycélium en amas. Six jours.
- FIG. 12. — Préparation d'une culture de trois semaines. On y observe des amas ronds, ovales ou d'une forme irrégulière, fortement colorés, et à côté d'eux de petits globules ou de petites gouttelettes d'un liquide épais, colorés faiblement et entourés d'un halo clair (gangue). Ce sont des corpuscules élémentaires.
- FIG. 13. — Amas protoplasmiques fortement colorés. Trois semaines.
- FIG. 14. — Amas protoplasmique volumineux, d'une forme irrégulière, et grosse boule fortement colorée. Quatre jours.
- FIG. 15. — Accumulation d'amas protoplasmiques en forme de boules fortement colorées, entourées d'une gangue. Quatre jours.
- FIG. 16. — Filtrat d'une culture de quelques semaines. Couche de corpuscules élémentaires faiblement colorés, entourés d'une gangue incolore. Quelques corpuscules montrent une coloration plus forte.
- FIG. 17. — Amas protoplasmiques très colorés de formes irrégulières, et en petits globules. Dix-sept jours.
- FIG. 18. — Amas très colorés et petits corpuscules faiblement colorés. Trois semaines.
- FIG. 19. — Image analogue à celle de la figure précédente. Trois semaines.
- FIG. 20. — Filtrat centrifugé d'une colonie de quelques semaines. L'image est analogue à celle de la figure 16.

Les photographies sont faites à un grossissement de 3.000, sans agrandissement ultérieur ni retouches. Les préparations photographiées ont été obtenues avec des centrifugats de cultures en bouillon-sérum.

CHIMISME GASTRIQUE ET INFECTIONS PARASITAIRES DU TUBE DIGESTIF

par R. DESCHIENS.

Il est communément admis que le suc gastrique normal ou hyperacide exerce une action empêchante sur les infections parasitaires du tube digestif et plus particulièrement sur les infections à Protozoaires.

Cette conception n'est pas fondée, à ma connaissance, sur des recherches expérimentales portant sur des zooparasites; elle paraît résulter, par extension, des données fournies par les recherches sur l'action antiseptique, d'ailleurs relative, du suc gastrique sur les bactéries.

Réaumur et Spallanzani, au XVIII^e siècle, ont noté que le suc gastrique enraye la putréfaction des aliments lorsqu'il leur est mélangé. Le suc gastrique bouilli conservant cette propriété, cette dernière doit être rattachée à l'action de l'acide chlorhydrique; N. Sieber a d'ailleurs démontré qu'à la dilution de 2,5 p. 1.000 l'acide chlorhydrique arrête la putréfaction de la viande pendant une semaine et détruit un grand nombre de microbes pathogènes ou non (bacille typhique, vibron cholérique, bacilles lactiques); mais il a constaté d'autre part qu'une telle solution chlorhydrique représentant comme taux d'acidité un suc gastrique très acide (acidité gastrique totale normale 4,6) était sans action sur d'autres bactéries et sur les formes sporulées des bactéries (spores de la bactérie charbonneuse).

En outre, Netter a montré que le suc gastrique affaiblit, puis supprime la virulence du bacille tuberculeux.

L'action bactéricide du suc gastrique apparaît, d'après ces données, inconstante selon les espèces microbiennes considérées, et négative pour les formes sporulées. Il n'est donc nullement démontré *a priori* que les kystes de Protozoaires et les œufs d'Helminthes soient attaqués ou détruits par un suc gastrique normal et je me propose dans cette étude de rechercher les

arguments propres à confirmer ou à infirmer l'hypothèse de l'action antiseptique du suc gastrique sur les kystes de protozoaires intestinaux.

*
* *

Les données du problème sont d'ordre clinique et expérimental.

1° Dans l'ordre clinique, j'ai recherché, dans le service de M. Le Noir, à l'hôpital Saint-Antoine, chez 42 gastro-entéropathes présentant une infection parasitaire du tube digestif, la valeur du chimisme gastrique, et, parallèlement, j'ai noté, chez 50 gastro-entéropathes non infectés, la valeur du chimisme gastrique dans des conditions identiques.

La comparaison des deux statistiques établies dans ces conditions procure déjà des indications précises.

2° Dans l'ordre expérimental, j'ai recherché d'une part l'action du liquide gastrique prélevé par tubage après repas d'épreuve sur des kystes d'*Entamæba dysenterix*, d'*Entamæba coli* et de *Giardia intestinalis*, et, d'autre part, l'action de solutions chlorhydriques de concentrations croissantes sur ces mêmes éléments dans les conditions les plus rapprochées des conditions naturelles de la digestion gastrique.

FAITS CLINIQUES

1° Étude du chimisme gastrique de 42 gastro-entéropathes présentant une infection ou une infestation parasitaire.

La détermination de l'infection parasitaire a été faite par l'examen des selles. Le repas d'épreuve utilisé a été le repas d'Ewald : 60 grammes de pain rassis et 200 cent. cubes d'infusion légère de thé. Les deux éléments fondamentaux du chimisme gastrique : l'acidité totale et l'acidité chlorhydrique ont été déterminés : la première par dosage avec la solution de soude décijnormale en présence de phtaléine du phénol comme indicateur coloré, le deuxième par dosage avec la solution de soude en présence d'une solution alcoolique de diméthyl-ami-

TABLEAU I. — Chimisme gastrique et infestations parasitaires.

	NOM ET SEXE	PARASITE	CHIMISME
1	♂ Frø....	<i>Entamæba dysenterix.</i>	H = 1,83 A = 2,48
2	♀ Rev....	<i>Giardia intestinalis.</i>	H = 0,94 A = 2,75
3	♀ Mara....	<i>Entamæba coli.</i>	H = 0 A = 0,54
4	♂ No....	<i>Blastocystis hominis.</i>	H = 1,75 A = 2,96
5	♂ Marc....	<i>E. coli.</i>	H = 1,82 A = 2,88
6	♀ Col....	<i>E. dysenterix.</i> <i>E. coli.</i>	H = 0,58 A = 1,60
7	♂ Freur....	<i>Endolimax nana.</i> <i>G. intestinalis.</i>	H = 2,44 A = 3,10
8	♀ Vost....	<i>E. dysenterix.</i>	H = 0,73 A = 1,82
9	♀ Pui....	<i>G. intestinalis.</i>	H = 0,36 A = 1,82
10	♀ Four....	<i>Iodamæba butschlii.</i> <i>Trichocephalus trichiurus.</i>	H = 0,36 A = 1,49
11	♀ Ben....	<i>E. nana.</i> <i>E. coli.</i> <i>Trichocephalus trichiurus.</i>	H = 0,47 A = 1,38
12	♀ Gi....	<i>G. intestinalis.</i>	H = 0,30 A = 1,60
13	♂ Gal....	<i>E. nana.</i>	H = 0,18 A = 2
14	♂ An....	<i>Trichocephalus trichiurus.</i>	H = 0 A = 0,43
15	♀ Le Col....	<i>Trichocephalus trichiurus.</i>	H = 0,9 A = 2,5
16	♂ Le Cam....	<i>G. intestinalis.</i>	H = 0 A = 0,73
17	♂ Lev....	<i>Trichocephalus trichiurus.</i> <i>B. hominis.</i>	H = 0,91 A = 2,37
18	♀ Pon....	<i>B. hominis.</i>	H = 0,54 A = 2,75
19	♀ Mar....	<i>Trichocephalus trichiurus.</i> <i>E. coli.</i>	H = 0,54 A = 2,53
20	♂ Leb....	<i>Trichocephalus trichiurus.</i>	H = 1,20 A = 2,33
21	♀ Seguy.	<i>B. hominis.</i>	H = 0 A = 0,54
22	♀ Mex....	<i>Trichocephalus trichiurus.</i>	H = 0 A = 0,43
23	♂ Chek....	<i>G. intestinalis.</i>	H = 0,54 A = 1,60
24	♀ F. M....	<i>G. intestinalis.</i>	H = 0,98 A = 1,82
25	♀ J....	<i>G. intestinalis.</i>	H = 2,44 A = 3,28
26	♀ Sch....	<i>G. intestinalis.</i>	H = 0,40 A = 0,87
27	♀ Bour....	<i>G. intestinalis.</i>	H = 0,18 A = 0,91
28	♀ Mai....	<i>G. intestinalis.</i>	H = 2,18 A = 2,55
29	♀ Sav....	<i>G. intestinalis.</i>	H = 0 A = 0,58
30	♀ Gal....	<i>E. dysenterix.</i>	H = 1,09 A = 2,55
31	♀ Cer....	<i>Trichocephalus trichiurus.</i>	H = 0 A = 0,54
32	♀ Ho....	<i>G. intestinalis.</i> <i>Taenia saginata.</i>	H = 0 A = 0,73
33	♂ Pou....	<i>E. dysenterix.</i>	H = 0,65 A = 1,82
34	♀ Eis....	<i>G. intestinalis.</i>	H = 0,18 A = 0,49
35	♀ Dem....	<i>B. hominis.</i>	H = 0,21 A = 1,71
36	♂ Pot....	<i>Blast. hominis.</i> <i>E. dysenterix.</i>	H = 1,13 A = 2,55
37	♀ Blu....	<i>Iodamæba butschlii.</i>	H = 0,21 A = 1,71
38	♀ Pel....	<i>Ascaris lombricoides.</i>	H = 1,02 A = 1,82
39	♀ Bas....	<i>Trichocephalus trichiurus.</i>	H = 0 A = 0,87
40	♀ Mar....	<i>G. intestinalis.</i>	H = 0,25 A = 1,82
41	♀ Bour....	<i>E. dysenterix.</i>	H = 0,73 A = 2,15
42	♀ Polak.	<i>G. intestinalis.</i>	H = 0,54 A = 1,71

doazobenzol comme indicateur coloré (technique de Guiart et Grimbert).

Rappelons que le suc gastrique normal donne, avec les

méthodes précédentes, les taux suivants : Acide chlorhydrique libre $H = 0,5$ p. 1.000, Acidité totale : $A = 1,7$ p. 1.000.

Les résultats d'ensemble ont été les suivants :

	POURCENTAGE
Anachlorhydrie : 9 cas	21
Hypochlorhydrie : 4 cas	40
Chimisme voisin de la normale ($H = 0,5$; $A = 1,7$) : 14 cas . .	33
Hyperchlorhydrie : 15 cas	36

Le tableau I indique le chimisme gastrique dans chaque cas et la nature de l'infection ou de l'infestation parasitaire observée.

2° Étude du chimisme gastrique de 50 gastro-entéropathes non parasités.

La valeur du chimisme gastrique a été établie dans les mêmes conditions que pour le groupe précédent.

Les résultats d'ensemble ont été les suivants :

	POURCENTAGE
Anachlorhydrie : 6 cas	12
Hypochlorhydrie : 11 cas	22
Chimisme voisin de la normale : 13 cas	26
Hyperchlorhydrie : 20 cas	40

Le tableau suivant juxtapose les deux statistiques.

TABLEAU II.

	SUJETS INFECTÉS p. 100	SUJETS NON INFECTÉS p. 100
Anachlorhydrie	21	12
Hypochlorhydrie	40	22
Ana- et hypo- réunis	31	34
Normaux	33	26
Hyperchlorhydrie	36	40

*
* *

Si l'on compare les deux statistiques obtenues en analysant, d'une part le chimisme gastrique des sujets parasités et, d'autre

part, celui des sujets non parasités, on note une grande similitude dans les résultats obtenus (Voir tableau II).

Le chiffre des anachlorhydriques est, il est vrai, plus considérable chez les sujets infectés (21 p. 100 contre 12 p. 100), mais celui des hypochlorhydriques est inférieur chez les sujets infectés à celui noté chez les sujets non infectés (10 p. 100 contre 22 p. 100).

En réunissant les anachlorhydriques et les hypochlorhydriques, on obtient les chiffres suivants absolument parallèles :

	POURCENTAGE
Sujets infectés	31
Sujets non infectés	34

L'insuffisance gastrique ne paraît donc pas plus fréquente chez les sujets parasités que chez ceux qui ne le sont pas; il est dès lors logique de se demander si le suc gastrique normal ou hyperacide exerce réellement une action empêchante sur les infections parasitaires en agissant sur les kystes de Protozoaires et les œufs d'Helminthes qu'il digérerait ou détruirait.

Les données statistiques que j'apporte s'inscrivent contre cette opinion; non seulement elles montrent que l'insuffisance gastrique n'est pas plus la règle chez les sujets infectés que chez ceux qui ne le sont pas, mais encore elles indiquent : 1° que le nombre des hyperchlorhydriques ou des euechlorhydriques infectés est voisin de celui des non infectés; 2° que le nombre des parasités à suc gastrique normal ou hyperchlorhydrique est aussi grand que celui des parasités hypo ou anachlorhydriques.

Une objection est à écarter : On peut faire remarquer que les hyperchlorhydriques infectés pouvaient être hypochlorhydriques au moment où l'infection s'est réalisée, pour devenir ensuite hyperchlorhydriques ou normaux à la date où a été fait le prélèvement gastrique. Cette objection ne paraît pas valable car on passe plutôt de l'hyperchlorhydrie à l'hypochlorhydrie que de l'hypochlorhydrie à l'hyperchlorhydrie; donc les sujets parasités en état d'insuffisance gastrique devraient être, sauf exception, demeurés insuffisants gastriques s'ils l'étaient au moment de l'infection.

RECHERCHES EXPÉRIMENTALES

1° Détermination de la vitalité des kystes utilisés.

Dans des essais de destruction et de digestion de kystes de protozoaires avec des liquides gastriques ou des solutions d'acide chlorhydrique de concentration croissante, une question se pose tout d'abord : quel est le test de la vitalité des kystes utilisés dans l'expérience ?

Kuenen et Swellengrebel (1913) admettent que les kystes de protozoaires morts se colorent par une solution à 1 p. 1.000 d'éosine dans l'eau, alors que les kystes vivants ne se colorent pas. Il est plus généralement admis que les kystes qui se colorent dans de telles conditions sont morts en effet, mais que par contre ceux qui ne se colorent pas ne sont pas nécessairement vivants.

Boeck (1921) utilise la méthode de Kuenen et Swellengrebel, mais contrôle la vitalité des kystes non colorables par leur étude morphologique. Ceux dont la structure est normale dans ce dernier groupe sont considérés par lui comme vivants.

La preuve incontestable de la vie ou de la mort des kystes consisterait à inoculer à l'animal de choix, le chat pour l'amibe dysentérique par exemple, les kystes dont on veut déterminer l'état, puis à voir si l'infection se développe ou non ; mais ce procédé est le plus souvent inutilisable car le temps nécessaire à la détermination de l'état des kystes, l'étude préalable de l'animal à inoculer et le temps de développement de l'infection, peuvent dépasser les limites de résistance des kystes mis en réserve pour l'expérience.

Récemment Yorke et Adams (1926) proposèrent un procédé qui consiste dans l'ensemencement des kystes dont on veut déterminer l'état sur un milieu de culture convenable (milieux du type Boeck-Dbrohlav pour l'amibe dysentérique par exemple). Si la culture est positive, la vitalité des kystes est démontrée. Ce test n'est malheureusement utilisable que pour les protozoaires intestinaux qui peuvent être cultivés. En outre,

la culture d'un protozoaire intestinal, en partant des kystes, est beaucoup plus difficile à obtenir qu'en partant de formes végétatives, les kystes mûrs se développent seuls et il faut parfois ensemençer de nombreux tubes pour avoir un départ. Quoi qu'il en soit, ce procédé, lorsqu'il est utilisable, est le plus rigoureux.

Hegner (1927) propose, comme test de la vie ou de la mort des kystes, l'essai du dékystement, si les kystes libèrent des formes végétatives, ils étaient évidemment vivants.

Nos recherches de digestion artificielle ont porté : 1° sur des kystes d'*Entamoeba coli* pour lesquels nous avons utilisé comme test la colorabilité par l'éosine, l'étude de la structure par le Lugol et le départ d'une culture sur un milieu ensemençé avec les kystes traités; 2° sur des kystes d'*Entamoeba dysenteriae* étudiés dans les mêmes conditions; 3° sur des kystes de *Giardia intestinalis* pour lesquels nous avons utilisé comme test la colorabilité par l'éosine et l'étude de la structure par le Lugol. La méthode de Yorke n'était pas utilisable dans ce cas, le milieu de culture de *Giardia* n'étant pas connu.

Avec l'épreuve de colorabilité ou de non-colorabilité par l'éosine l'étude de la structure des kystes colorés par le Lugol, on obtient chez *Entamoeba coli* des résultats parallèles à ceux obtenus par la méthode des cultures de Yorke; on doit donc considérer, sauf exception, que lorsqu'un kyste d'amibe est incolorable par l'éosine et présente une structure normale après coloration par le Lugol, il est vivant. Par extension, on peut conclure que, lorsqu'un kyste de *Giardia* répond à ces mêmes conditions, il est vivant.

Dans les recherches sur la colorabilité des kystes par l'éosine, il y a lieu d'opérer en présence d'un excès de colorant et d'assurer un contact de quelques minutes entre le colorant et le matériel à colorer lorsqu'on opère en milieu acide. Les débris de tissus d'origine animale tels que les fibres musculaires et le tissu conjonctif en voie de digestion fixent fortement l'éosine aux dépens des kystes, d'où la nécessité d'opérer en présence d'un excès de colorant afin de saturer l'éosinophilie de ces éléments et de permettre la fixation éventuelle du colorant sur les kystes. J'ai noté que des kystes de *Giardia intestinalis*, après vingt-quatre heures de séjour dans une solution chlorhydrique

à 6,2 p. 100, se coloraient par l'éosine dans la proportion de 10 p. 100 après quelques secondes de contact, dans la proportion de 80 p. 100 après une minute de contact et de 100 p. 100 après cinq minutes de contact; tous les kystes étaient altérés dans leur structure; il s'agissait donc de kystes morts.

2° Essais de digestion des kystes de protozoaires.

Je me suis placé dans les conditions les plus rapprochées des conditions naturelles, c'est-à-dire que les liquides de digestion utilisés étaient à la température de 37° pendant la durée de l'expérience. La durée des épreuves de digestion a été de deux à trois heures; les expériences ont été poursuivies vingt-quatre heures, mais la durée de deux heures pour apprécier l'action parasiticide des liqueurs utilisées était suffisante, car si le temps moyen d'évacuation totale de l'estomac de l'homme est de trois heures on sait que les aliments sont évacués par portions, à intervalles de quelques minutes, et que le début de l'évacuation débute une demi-heure environ après l'ingestion des aliments; une petite quantité d'aliments franchissent même généralement le pylore par « surprise pylorique » au moment où le premier bol alimentaire atteint l'estomac. J'aurais l'occasion de reprendre ces considérations au moment de la discussion de mes données expérimentales.

a) DIGESTION PAR LE LIQUIDE GASTRIQUE RECUEILLI PAR TUBAGE APRÈS REPAS D'EWALD.

Le liquide gastrique utilisé dans ces recherches a été prélevé par tubage au tube de FAUCHER de sujets euchlorhydriques ou hyperchlorhydriques une heure après ingestion d'un repas d'EWALD. Les taux d'acidité totale (A) et d'acide chlorhydrique (H) ont été établis par dosage selon la méthode de GUIART et GRIMBERT. Je rappelle qu'avec cette méthode, pour un suc gastrique normal, $AT = 1,7$ p. 1.000 et $H = 0,5$ p. 1.000. Les taux d'acidité ont été établis immédiatement avant l'expérience.

α) *Essais concernant des kystes de Giardia intestinalis.*

Le liquide gastrique utilisé présentait une acidité totale (AT) de 1,7 p. 1.000 et un taux d'acide chlorhydrique libre (H) de 0,73 p. 1.000; il s'agissait donc d'un liquide gastrique légèrement hyperchlorhydrique.

Le pourcentage des kystes vivants, établi avant l'expérience et portant sur 50 spécimens, indiquait 72 p. 100.

Les kystes sont mis en suspension dans 10 cent. cubes de liquide gastrique et placés à l'étuve à 37°; un témoin contenant des kystes en suspension dans 10 cent. cubes d'eau physiologique est également mis à l'étuve.

Après trois heures de séjour à l'étuve, 55 p. 100 des kystes sont vivants; on note en outre la présence de formes végétatives dékystées, mortes, indiquant non seulement que les kystes étaient vivants, mais encore qu'ils ont rencontré un milieu favorable à la libération de leur contenu.

Dans le tube témoin, on note 70 p. 100 de kystes vivants et de rares formes végétatives mortes indiquant que le dékystement peut être obtenu en dehors de suc gastrique dans un milieu isotonique et que seule la température de 37° paraît utile pour obtenir ce dékystement.

Après vingt-quatre heures, 4 p. 100 des kystes paraissent vivants dans le tube contenant le liquide gastrique et le témoin.

Après quarante-huit heures, tous les kystes sont morts.

En résumé, après trois heures de digestion (temps moyen de l'évacuation gastrique totale) à 37°, 55 p. 100 des kystes de *Giardia intestinalis* sont vivants et probablement infectieux.

β) *Essais concernant des kystes d'Entamœba dysenteriae.*

Des kystes d'*Entamœba dysenteriae* ont été traités dans les mêmes conditions par un liquide gastrique dont les caractéristiques sont les suivantes : AT = 2,33, H = 1,60; il s'agit donc d'un suc gastrique hyperacide et hyperchlorhydrique.

Avant l'expérience, 80 p. 100 des kystes sont vivants : ce pourcentage a été établi par étude de la colorabilité par l'éosine et de la structure. La culture était positive en partant de ces

kystes dans trois tubes sur 12 ensemencés (milieu œuf total, eau physiologique albuminée PH = 7,6) (1).

Après deux heures quarante-cinq de séjour à l'étuve à 37° 2 tubes de culture sur 12 ont donné une culture positive.

Après vingt et une heures, tous les kystes étaient morts.

En résumé, après deux heures quarante-cinq de digestion à 37°, un certain nombre de kystes de *E. dysenteriae* sont encore vivants et probablement infectieux.

b) ACTION DE L'ACIDE CHLORHYDRIQUE.

Des essais ont été réalisés dans ce sens par Yorke et Adams (1926) qui ont traité des kystes d'*Entamoeba dysenteriae* par des solutions d'acide chlorhydrique pendant trente minutes, à la température du laboratoire (T = 20-22°) et à l'étuve à 37°.

La durée de trente minutes peut répondre à un transit total rapide de kystes dans l'estomac au cours d'un repas léger et liquide, condition réalisable dans la nature. Ces auteurs notent qu'après action d'une solution d'acide chlorhydrique à 2 p. 1.000 à 37° pendant trente minutes, des kystes d'*E. dysenteriae*, ensemencés sur milieu favorable, étaient susceptibles de donner une culture positive, c'est-à-dire étaient encore vivants. Dans les mêmes conditions, une solution d'HCL à 10 p. 1.000 — chiffre très supérieur au taux d'acidité gastrique normal — ne tuait pas en trente minutes la totalité des kystes qui, ensemencés sur milieux favorables, fournissaient une culture moins riche que la précédente, mais positive.

Les recherches de Yorke et Adams portant sur des solutions chlorhydriques dans l'eau, il y a là un facteur modifiant la tonicité du milieu que j'ai écarté en remplaçant l'eau par une solution d'eau physiologique à 9 p. 1.000.

a) Essais concernant *Giardia intestinalis*.

J'ai préparé des solutions d'acide chlorhydrique dans l'eau physiologique aux titres suivants pour 1.000 : T₁ = 0,8, T₂ = 1,6, T₃ = 3,4, T₄ = 6,25, T₅ = 12,5, T₆ = 25, T₇ = 50, T₈ = 100.

(1) R. DESCHIENS Recherches sur la culture d'*E. dysenteriae* (C. R. Soc. Biol., 6, 1927, p. 1356-1358).

TABLEAU III. — Action d'un liquide gastrique normal sur les kystes de *Giardia intestinalis*.
(Séjour à l'étuve à 37°).

Kystes ne se colorant pas à l'éosine K (—)
 Kystes présentant une structure normale. K Sn

	15 DÉCEMBRE 1928 (17 heures)	15 DÉCEMBRE 1928 (20 heures)	16 DÉCEMBRE 1928 (17 heures)	17 DÉCEMBRE 1928 (17 heures)
Suspension dans le liquide gastrique : H = 0,73, AT = 1,7.	K (—) = 72 p. 100. K SN = 72 p. 100.	K (—) = 60 p. 100. K SN = 35 p. 100.	K (—) = 40 p. 100. K SN = Très rares.	K (—) = 40 p. 100. K SN = 0.
Témoin. Suspension dans l'eau physiologique.	K (—) = 72 p. 100. K SN = 72 p. 100.	K (—) = 70 p. 100. K SN = 70 p. 100.	K (—) = 50 p. 100. K SN = Très rares.	K (—) = 40 p. 100. K SN = 0.

TABLEAU IV. — Action de solutions d'acide chlorhydrique dans l'eau physiologique
sur les kystes de *Giardia intestinalis*.

Kystes ne se colorant pas par l'éosine K (—)
 Kystes présentant une structure normale. K Sn

	TUBE TÉMOIN Eau physiologique 8 p. 1.000	T ₁ HCl 0,8 1.000	T ₂ HCl 1,6 1.000	T ₃ HCl 3,1 1.000	T ₄ HCl 6,25 1.000	T ₅ HCl 12,5 1.000	T ₆ HCl 25 1.000	T ₇ HCl 50 1.000	T ₈ HCl 100 1.000
15 décembre (17 h.)	K (—) = 72 p. 100. K SN = 72 p. 100.	<i>Id.</i>	<i>Id.</i>	<i>Id.</i>	<i>Id.</i>	<i>Id.</i>	<i>Id.</i>	<i>Id.</i>	<i>Id.</i>
15 décembre (49 h.)	K (—) = 60 p. 100. K SN = 60 p. 100.	K (—) = 30 p. 100. K SN = 48 p. 100.	K (—) = 30 p. 100. K SN = 48 p. 100.	K (—) = 50 p. 100. K SN = 50 p. 100.	K (—) = 50 p. 100. K SN = 40 p. 100.	K (—) = 50 p. 100. K SN = 40 p. 100.	K (—) = 50 p. 100. K SN = 40 p. 100.	K (—) = 50 p. 100. K SN = 40 p. 100.	K (—) = 50 p. 100. K SN = 40 p. 100.
16 décembre (17 h.)	K (—) = 50 p. 100. K SN = Très rares.	K (—) = 30 p. 100. K SN = Très rares.	K (—) = 15 p. 100. K SN = Très rares.	K (—) = 50 p. 100. K SN = 50 p. 100.	K (—) = 50 p. 100. K SN = 40 p. 100.	K (—) = 50 p. 100. K SN = 40 p. 100.	K (—) = 50 p. 100. K SN = 40 p. 100.	K (—) = 50 p. 100. K SN = 40 p. 100.	K (—) = 50 p. 100. K SN = 40 p. 100.

Kystes morts,
Absence de formes végétatives.

Dans 10 cent. cubes de chacune de ces solutions versées dans un tube à essai furent mis en suspension des kystes de *Giardia intestinalis* dont 72 p. 100 étaient vivants. Ces tubes furent placés à l'étuve à 37° avec un témoin à l'eau physiologique à 9 p. 1.000 comme dans les expériences précédentes.

Après deux heures d'action de HCl à 37° on note la présence de kystes incolorables par l'éosine et de structure normale, pouvant, par conséquent, être considérés comme vivants, dans les proportions suivantes $T_1 = 60$ p. 100, $T_2 = 55$ p. 100, $T_3 = 50$ p. 100, $T_4 =$ rares. On note dans tous ces tubes la présence de formes végétatives désenkystées mortes. Dans le tube témoin on note 70 p. 100 de kystes vivants après l'expérience et la présence de formes végétatives désenkystées mortes. Dans un tube témoin, à la température du laboratoire (20°) on ne note pas la présence de formes végétatives. Dans les tubes T_3 , T_6 , T_7 , T_8 , la plupart des kystes sont incolorables par l'éosine mais ils ont perdu toute structure et présentent un aspect vacuaire; ils doivent donc être considérés comme morts. Dans ces solutions les cellules épithéliales elles-mêmes, éléments incontestablement morts, ne prennent pas l'éosine; il semble qu'on se trouve en présence d'une coagulation brutale et d'une transformation empêchant la pénétration du colorant à l'intérieur de la masse coagulée.

Après vingt-quatre heures on note dans T_1 et T_2 et le témoin la présence de très rares kystes montrant une structure voisine de la normale et paraissant vivants, mais il convient d'être réservé sur ce point.

Le tableau IV indique les résultats de l'expérience.

En résumé, après deux heures de traitement par des solutions chlorhydriques de concentrations croissantes, on trouve des kystes de *Giardia intestinalis* pouvant être considérés comme vivants dans des liqueurs chlorhydriques à 0,8, 1,6, 3,1 et 6,2 p. 1.000; rappelons que le taux d'acidité totale du liquide gastrique normal (repas d'Ewald) est de 1,7; les kystes de *Giardia* résistent donc à l'action d'une solution d'acide chlorhydrique plus de trois fois supérieure à l'acidité normale du liquide gastrique et sont même susceptibles de libérer leur contenu jusqu'à une concentration de 6,2 p. 100.

L'apparition de formes végétatives deux heures après l'action

de la chaleur à 37° dans le liquide gastrique, la solution chlorhydrique ou l'eau physiologique, est à souligner.

Hegner (1927) en faisant ingérer à des rats des kystes de *Giardia intestinalis* a obtenu le dékystement et une survie de formes végétatives dans l'estomac du rat dont le suc gastrique est moins acide, il est vrai, que celui de l'homme.

En ce qui concerne nos recherches, le temps de deux heures à partir du moment de l'action de la chaleur à 37° sur les kystes répond à l'intervalle de temps pendant lequel le contenu gastrique est évacué dans le duodénum; les formes végétatives libérées doivent donc l'être généralement dans le duodénum et le haut jéjunum, lieu d'habitat des giardies et rencontrer le milieu favorable à leur développement. Il résulte en outre de cette expérience que la température de 37° et certaines conditions d'humidité et d'isotonicité suffisent à déterminer le dékystement de *Giardia intestinalis* dans un temps inférieur à deux heures. Ces faits sont à rapprocher de ceux constatés par Yorke et Adams (1926) qui permettent à ces auteurs de conclure que le dékystement d'*Entamæba dysenterix* est conditionné par une certaine humidité et la température de 37° sans que l'action du suc gastrique et du suc pancréatique soit nécessaire.

Le moment du dékystement paraît lié à une certaine durée d'action de la chaleur qui paraît en rapport chez *Giardia intestinalis* et *Entamæba dysenterix* avec la localisation intestinale de ces parasites et répondre au temps moyen nécessaire au transport des kystes jusqu'à la région d'habitat du protozoaire. J'ai noté que le dékystement de *Giardia intestinalis* s'obtenait *in vitro* dans un temps inférieur à deux heures. Hegner obtient le dékystement de *Giardia intestinalis* dans l'estomac du rat en une demi-heure. Ces temps répondent à la durée moyenne du transit gastrique qui commence trente minutes environ après l'ingestion d'aliments et est total en trois heures; ils correspondent également à la durée du transit intestinal nécessaire pour atteindre la portion sous-ampullaire du duodénum et le haut jéjunum, étages intestinaux répondant à la localisation élective des giardies.

Yorke et Adams étudiant le dékystement d'*Entamæba dysenterix* à 37° dans un milieu de culture favorable du type Boeck, notent que c'est entre trois heures et demie et vingt-trois

heures après le début de l'expérience, avec maximum pour dix heures et demie, que les amibes se dékystent. Or, le temps moyen du transit du chyme pour atteindre le gros intestin, habitat d'*Entamoeba dysenteriae*, est de neuf heures et par conséquent voisin de la période correspondant au maximum de dékystement.

β *Essais concernant Entamoeba coli.*

Des kystes d'*E. coli* lavés et dont 75 p. 100 ont été reconnus vivants au début de l'expérience, ont été mis en suspension dans des solutions d'acide chlorhydrique dans l'eau physiologique aux concentrations suivantes p. 1.000 : $T_1 = 4$, $T_2 = 2,5$, $T_3 = 5$, $T_4 = 10$, $T_5 = 25$, $T_6 = 50$, $T_7 = 100$. Les tubes contenant ces solutions avec les kystes en suspension ont été placés à l'étuve à 37° pendant deux heures trente avec un témoin à l'eau physiologique à 9 p. 1.000. A la fin de l'expérience, on note des kystes vivants dans les tubes suivants et dans les proportions suivantes : $T_1 = 40$ p. 100, $T_2 = 30$ p. 100, $T_3 = 20$ p. 100. Dans les tubes T_4 , T_5 , T_6 , T_7 , certains kystes ne se coloraient pas par l'éosine, mais avaient perdu toute structure et ont été considérés comme morts. Dans le tube témoin, 60 p. 100 des kystes étaient vivants.

Les kystes contenus dans les tubes T_1 , T_2 , T_3 et dans le tube témoin ont donné, après ensemencement sur des milieux de culture du type Boeck (œuf total, eau physiologique albuminée $pH = 6,5$), des cultures positives confirmant la vitalité des kystes déjà présumée par l'étude de la structure jointe à la colorabilité par l'éosine.

En résumé des kystes d'*Entamoeba coli* soumis pendant deux heures trente à l'action de solutions chlorhydriques sont encore vivants après cette épreuve jusqu'à une concentration de 5 p. 1.000, chiffre près de trois fois supérieur à l'acidité du liquide gastrique normal qui est de 1,7 p. 1.000.

*
* *

Des recherches expérimentales concernant des essais de digestion artificielle d'œufs d'Helminthes sont en cours, et nous pouvons dès maintenant indiquer, ce qui d'ailleurs est un fait

connu de longue date, que la résistance de ces œufs est dans l'ensemble très supérieure à celle des kystes de protozoaires.

*
* *

Il résulte de l'ensemble de ces données cliniques et expérimentales les faits suivants :

1° Chez les sujets infectés par des parasites, la proportion des hypochlorhydriques, des euchlorhydriques et des hyperchlorhydriques est sensiblement la même que chez les sujets non infectés. Argument déjà favorable à l'absence de toute action empêchante du suc gastrique sur les infections parasitaires.

2° Des digestions artificielles de kystes de protozoaires intestinaux (*Entamoeba dysenteriae*, *E. coli*, *Giardia intestinalis*) par des liquides gastriques normaux ou hyperacides et par des solutions d'acide chlorhydrique jusqu'à la concentration de 6,2 p. 1.000 (liqueur gastrique normale = 1,7 p. 1.000, à la température de 37° pendant deux à trois heures, ne détruisant pas la vitalité de 12,5 p. 100 au moins des kystes de ces protozoaires.

A ces faits, il convient d'ajouter que les kystes des Protozoaires intestinaux et les œufs d'Helminthes sont ingérés avec de l'eau de boisson ou au cours d'un repas.

L'eau de boisson, introduite dans l'estomac à jeun, ne séjourne que quelques minutes dans cet organe et dilue le suc gastrique, qui pourrait être à ce moment sécrété, dans des proportions telles qu'aucune action destructive sur les kystes ou les œufs ingérés au même moment ne peut être admise.

Prenons au contraire le cas de l'ingestion de kystes ou d'œufs au cours d'un repas. Nous savons que les kystes de Protozoaires et très probablement les œufs d'Helminthes à parois, encore plus épaisses, résistent pendant deux à trois heures dans des solutions chlorhydriques trois fois plus concentrées que le liquide gastrique. Or, les examens de radiologie gastro-intestinale montrent que dans les premières minutes qui suivent l'ingestion d'un repas, une portion des aliments franchit le pylore (surprise pylorique), puis qu'une demi-heure environ après cette première évacuation de sur-

prise, des évacuations fragmentaires se succèdent à intervalles de quelques minutes jusqu'à ce que l'estomac soit évacué en totalité dans un temps moyen de trois heures.

Si le repas était infectieux, des éléments parasitaires ont certainement franchi le pylore, soit avec le premier transit fragmentaire, soit avec ceux qui lui succèdent, et, en tout cas, avant que trois heures ne se soient écoulées. Comme nous savons que les kystes de protozoaires résistent pendant au moins trois heures à l'action de liqueurs trois fois plus acides que le liquide gastrique, il est évident qu'ils n'ont pu être détruits. Le « pouvoir d'arrêt », ou l'action empêchante du suc gastrique sur les infections parasitaires, est donc infirmé par les données de la clinique et celles de l'expérimentation. Si l'insuffisance gastrique peut influencer favorablement la greffe parasitaire, ce ne serait pas directement du fait de la carence gastrique, mais par les troubles intestinaux à distance qu'elle peut provoquer.

RÉSUMÉ

Dans cette étude, je me suis proposé de vérifier l'opinion d'après laquelle le liquide gastrique normal ou hyperacide exercerait une action empêchante sur les infections parasitaires intestinales.

Un premier groupe de faits chimiques indique que si l'on compare la valeur du chimisme gastrique chez quarante-deux gastro-entéropathes parasités d'une part, et celle du chimisme gastrique de cinquante gastro-entéropathes non parasités d'autre part, on note un parallélisme étroit : sujets parasités : hyperchlorhydriques et anachlorhydriques : 31 p. 100, sujets non parasités : d'hypochlorhydriques et anachlorhydriques : 34 p. 100.

Des essais de digestion ou de destruction de kystes de *Giardia intestinalis*, d'*Entamæba coli* et d'*E. dysenterix* par des liquides gastriques normaux ou hyperacides humains ou des solutions chlorhydriques de concentrations croissantes, à la température de 37° pendant deux à trois heures (durée moyenne du transit gastrique total après un grand repas), indiquent : 1° que la généralité des kystes demeurent vivants (épreuve de l'éosine,

étude de la structure, culture positive) après l'action du liquide gastrique normal ou hyperacide et de solutions chlorhydriques; 2° que jusqu'à la concentration élevée de 6,2 p. 1.000 d'HCl un certain nombre de kystes demeurent vivants (12,5 p. 100 au moins).

Il résulte de ces faits que le liquide gastrique normal ou hyperacide n'exerce aucun pouvoir d'arrêt sur les infections parasitaires et que si l'insuffisance gastrique est une condition favorisant des infections parasitaires, ce ne serait pas du fait de la carence d'acidité gastrique, mais à cause des troubles intestinaux à distance qu'elle peut engendrer.

Il convient de souligner que le temps nécessaire à un protozoaire pour se dékyster dans des conditions favorables *in vitro*, correspond au temps nécessaire à ce protozoaire pour atteindre *in vivo*, en prenant l'ingestion pour point de départ, l'étage digestif de sa localisation.

(Institut Pasteur, Laboratoire de Prostitologie.)

BIBLIOGRAPHIE

- BOECK (W. C.) — The thermal death point of the human intestinal protozoa cysts. (*Amer. Journ. of Hyg.*, 1921, t. I, f. 4, p. 355); On the longevity of human intestinal protozoa cysts. (*Amer. Journ. of Hyg.*, 1921, t. I, f. 5 et 6, p. 527).
- HEGNER (R.). — Excystation and infection in the rat with *Giardia lamblia* from man. (*The Amer. Journ. of Hyg.*, t. VII, f. 4, 1927, pp. 443-447).
- KUENEN (W. A.) et SWELLENGREBEL (N. H.) Die entamöben der und ihre praktische Bedeutung. (*Centrablatt für Bakteriologie*, t. LXXI, f. I, Abt orig. 1913, p. 378).
- LAMBLING (E.). — Précis de Biochimie 1925 (Masson) p. 164-165.
- PENFOLD (W.), WOODCOCK (H. M.) et DREW (A. H.). — The excystation of *Entamoeba histolytica* (Tetragena) as an indication on the vitality of the Cysts. (*Brit. Med. Journ.*, 1916, t. I, p. 714).
- YORKE (W.) et ADAMS (A. R. D.). — Observations on *Entamoeba histolytica*. I Développement of Cysts, Excystation, and development of excysted amoeba in vitro. (*Annals of Trop. Med. and Parasitology*, 1926, t. XX, f. 3, pp. 289-294 (4 planches); Observations on *Entamoeba histolytica*. II. Longevity of the Cysts in vitro and their resistance to heat and to various drugs and chemicals. (*Ann. of Trop. Med. and Parasitology*, 1926, t. XX, f. 3, pp. 317-326).

**LA DISSOCIATION DES FONCTIONS SEXUELLES
ET NUTRITIVES
(DISSOCIATION GONO-TROPHIQUE)
D'ANOPHELES MACULIPENNIS
COMME CAUSE DU PALUDISME DANS LES PAYS-BAS
ET SES RAPPORTS
AVEC « L'INFECTION DOMICILIAIRE »**

par N. H. SWELLENGREBEL.

(Institut d'hygiène tropicale d'Amsterdam.)

I. — Introduction.

THÉORIE DE L'INFECTION DOMICILIAIRE.

La théorie de « L'INFECTION DOMICILIAIRE » du paludisme, énoncée par Chagas (bibliographie dans Davis 1926), soutenue par les études approfondies de James (1926), représente l'habitation humaine comme le foyer principal de l'infection palustre. Parmi les Anophèles des maisons on trouve des individus y faisant un séjour si long, qu'il suffit à la maturation des sporozoïtes, avant que ces moustiques changent de domicile. Si ces Anophèles sédentaires sont impaludés, la transmission de l'infection à l'homme est ainsi assurée. Les conclusions pratiques de cette théorie conduisent à rendre les maisons impropres à un séjour prolongé des Anophèles et à y détruire les moustiques dans le but de frapper le parasite du paludisme.

OBJECTIONS A CETTE THÉORIE.

D'autres savants (par exemple Roubaud 1920(1), 1928 B, Barber et Hayne 1924) s'opposent à ces idées : l'Anophèle n'est pas du tout sédentaire ; toute la population anophélienne d'un abri quelconque (ou une grande partie : Missiroli et Hackett 1927) le quitte chaque soir. L'Anophèle qui a contracté le paludisme dans une maison l'aura quittée longtemps avant l'accomplissement du cycle amphigonique du Plasmodium. Les chances qu'il rentre plus tard dans une maison, au moment de l'apparition des sporozoïtes salivaires, seront considérables dans le cas où les Anophèles ne visitent rien que des maisons ; elles diminueront dans la proportion que la population anophélienne des étables s'accroît aux dépens de celle des maisons. Ces auteurs nient le rôle de la maison comme centre de l'infection anophélienne (Kligler et Liebman 1928) et l'utilité de la destruction des Anophèles domestiques (Davis 1926).

POSSIBILITÉ DE CONCILIER LES OPINIONS CONTRADICTOIRES.

On ne peut que reconnaître la justesse de ces objections. D'autre part, les faits qui indiquent que le paludisme se contracte dans certaines maisons (voir par exemple Grassi 1920 ; Korteweg 1920 ; Honig 1922), sont tellement significatifs, qu'on ne doit pas rejeter la théorie de l'infection domiciliaire sans une tentative sérieuse de la sauver. Tout en admettant l'instabilité des Anophèles comme règle générale, on se demande s'il n'existe pas une force les retenant à domicile, sans altérer leur faculté de transmettre le paludisme.

L'épidémiologie du paludisme dans les Pays-Bas nous offre l'exemple d'une telle force. Nous en étudierons la nature et l'origine et dans quelle mesure elle peut servir de base générale pour soutenir la théorie que nous envisageons.

(1) Cependant, dès 1922, Roubaud a insisté sur le fait que l'hiver transformait les conditions de déplacements spontanés des Anophèles en une condition de sédentarité obligatoire, favorable à la transmission palustre parce qu'elle annule les effets protecteurs de la déviation animale (*Bull. Soc. Path. Exot.*, 8 février 1922, p. 119). Le même auteur a développé en 1925, 1928, des notions sensiblement analogues à celles que nous exposerons dans ce travail et qu'on retrouvera aussi dans notre publication de 1922 B.

II. — La situation actuelle.

ELLE DEMANDE UNE EXPLICATION.

L'épidémiologie du paludisme dans les régions littorales des Pays-Bas est difficile à comprendre :

1° Quelques-unes seulement de ces régions sont impaludées, tandis que les autres sont indemnes, quoique l'extension des surfaces stagnantes n'y soit pas moins grande.

2° La poussée annuelle de tierce bénigne atteint son

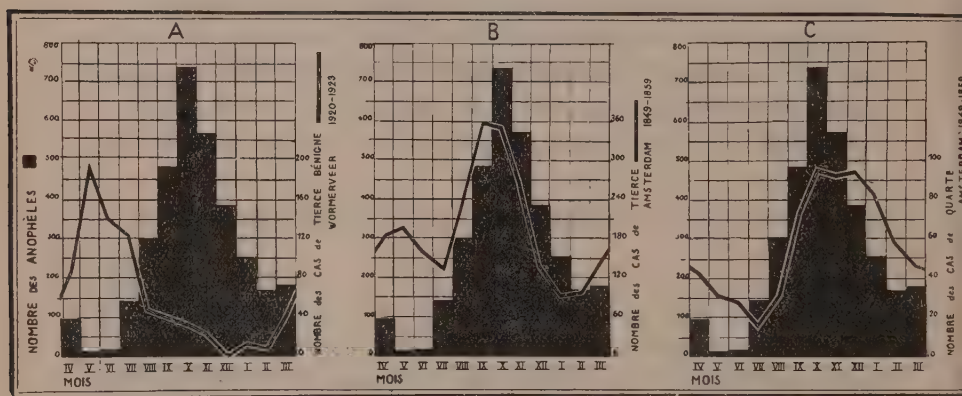


FIG. 1. — Comparaison de la variation mensuelle de la densité actuelle des Anophèles avec le cours de l'épidémie de tierce de nos jours et avec celui de tierce et de quarte au milieu du XIX^e siècle.

Courbes verticales A., B., C. : Nombre mensuel des Anophèles par étable, dans trois étables situées près d'Amsterdam (observation en 1926, 1927, 1928).

Courbe A. : Somme des cas de tierce, observés dans chaque mois des trois années épidémiques 1920-1922, dans un village près d'Amsterdam.

Courbe B. : Nombre mensuel moyen des cas de tierce, observé à Amsterdam en 1849-1859.

Courbe C. : Nombre mensuel moyen des cas de quarte, observé à Amsterdam en 1849-1859.

maximum au printemps, saison de densité anophélienne minimale (fig. 1^A); elle précède de trois à cinq mois la saison de la fréquence maximale des Anophèles infectés (fig. 2^A).

Dans les lieux impaludés de notre pays les Anophèles sont distribués pendant l'été de manière à ne laisser qu'une proportion de un moustique par habitation humaine pour 200 dans

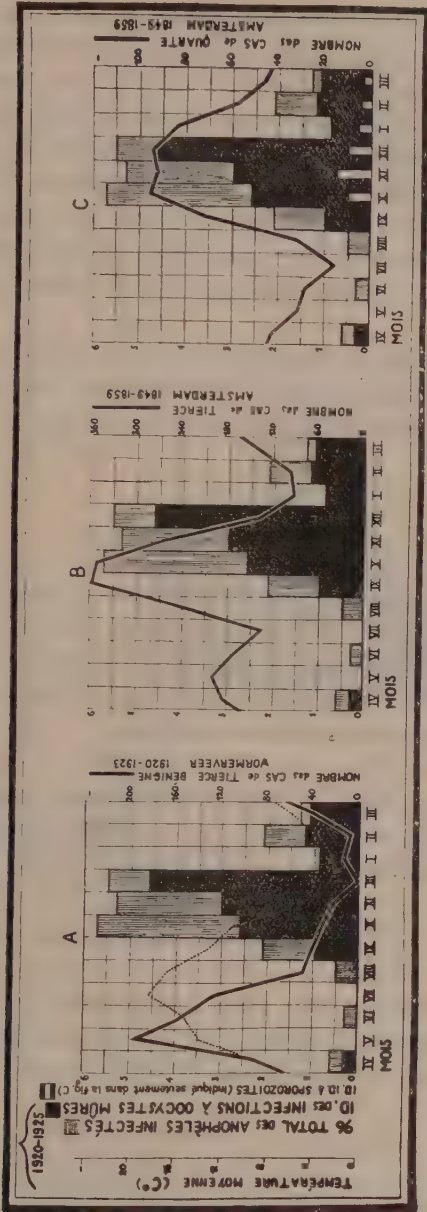


Fig. 2. — Comparaison de la variation du nombre actuel des Anophèles impaludés avec le cours de l'épidémie de tierce de nos jours et avec celui de tierce et de quarte au milieu du xix^e siècle.
Colonnes verticales A., B., C. : Pourcentage de tous les Anophèles trouvés impaludés dans les maisons de la région malarique autour d'Amsterdam. Nombre examiné : 40.000, années 1920-1925.
Partie basale noire des colonnes : Pourcentage des Anophèles porteurs d'oocystes mûrs.
Colonne blanche dans la partie noire : Pourcentage des Anophèles porteurs de sporozoïtes salivaires (Indiqué seulement dans la figure C.).
Courbes A., B., C. : ont la même signification que celles de la figure 1.
Courbe pointillée : Température mensuelle moyenne (en plein air), années 1920-1925 (Indiquée seulement dans la figure A.).

une étable (1). Les Anophèles qui contractent le paludisme

(1) Les chiffres exacts pour les quatre mois de mai à août sont : 5-9 Anophèles par habitation humaine et 1.095-2.210 par étable (années 1920-1928).

dans une maison doivent la quitter pour pondre, après un laps de temps de trois à quatre jours, délai insuffisant pour la maturation des sporozoïtes. Dans les districts ruraux, où presque chaque ferme compte une ou plusieurs étables habitées, les chances que les Anophèles, en revenant des gîtes, évitent l'étable pour s'abriter dans la maison, ne s'élèvent guère au delà de 1 : 200. On ne s'étonnera donc pas que la recherche des Anophèles impaludés (excepté les stades initiaux des oocystes) reste infructueuse pendant l'été (Swellengrebel 1922-1924).

Cette situation n'a rien de surprenant pour une région où les étables exercent une attraction prépondérante sur les Anophèles. La seule chose étonnante c'est qu'elle permet encore l'existence du paludisme.

FIXATION AUTOMNALE DES ANOPHÈLES.

En septembre un changement fondamental s'accomplit. La production des œufs cesse presque complètement dès le commencement de ce mois. Par conséquent les Anophèles n'ont plus besoin de s'éloigner des localités où le hasard les avait amenés quand cette nouvelle période s'annonçait. Ils « SE FIXENT », soit dans les maisons, soit dans les étables. Leur va-et-vient de la maison à l'étable, sans interruption pendant l'été, se trouve maintenant interrompu (1). La population anophélienne des maisons ne voit plus ses membres se perdre dans les étables.

La cessation de l'activité reproductrice, cause de la « FIXATION » des Anophèles, n'entraîne pas la disparition du besoin de se nourrir de sang. Les femelles en sont encore très avides au commencement de l'automne et leur appétit ne diminue que lentement au cours des mois qui suivent (fig. 4^A).

(1) Cet effet de la « fixation » automnale est démontré par l'expérience suivante : en capturant, pendant l'été, tous les Anophèles dans un abri quelconque, la population répare ses pertes dans un délai de un à neuf jours. En répétant cette opération en septembre, la réparation est très imparfaite parce qu'elle ne s'accomplit que grâce à l'éclosion des quelques larves retardées qui survivent encore. Répétée en octobre le local reste vide, quoique les abris avoisinants se montrent pleins d'Anophèles.

CONSÉQUENCES DE LA FIXATION AUTOMNALE.

La « fixation » automnale des Anophèles a un double effet :

1° UNE AUGMENTATION CONSIDÉRABLE DU NOMBRE DES MOUSTIQUES dans leurs abris. Elle s'observe déjà depuis la fin de juillet. Jusqu'en août elle s'explique par la vie larvaire, très active en juillet et août. Au cours de septembre les larves disparaissent vite, parce que l'ovulation a cessé, ce qui se traduit aussi par

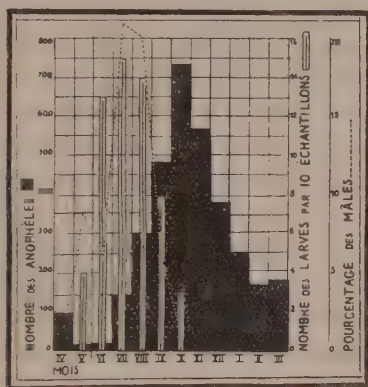


FIG. 3. — Comparaison de la variation mensuelle de la densité des Anophèles avec celle des larves et avec le nombre relatif des mâles.

Colonnes larges noires : Nombre mensuel des Anophèles par étable, dans trois étables situées près d'Amsterdam. (Observations en 1926-1928).

Colonnes étroites blanches : Pourcentage mensuel des mâles dans les mêmes environs (années 1920-1928).

Courbe : Nombre mensuel de larves par 10 échantillons prélevées avec un poëlon de 48×2 c. c. 5 (années 1929 et 1924-1928).

la disparition des mâles (fig. 3). Malgré cela, le nombre des femelles continue à augmenter, pour atteindre son maximum en septembre ou octobre. Cette augmentation n'est plus la conséquence de la multiplication, mais de la « fixation » des Anophèles, qui ne s'oppose pas à l'entrée des moustiques dans leurs abris mais bien à leur sortie, en leur ôtant le besoin de s'éloigner de nouveau.

2° LA RÉTENTION DANS LES MAISONS DES ANOPHÈLES IMPALUDÉS porteurs de stades plus avancés de l'infection palustre. Ces moustiques ne s'envolent plus pour aller pondre et, par suite,

ils ne se perdent plus dans les étables (Swellengrebel, 1922-1924). Au cours des mois de septembre à décembre (1) les oocystes parviennent graduellement à la maturité, malgré la température peu favorable (fig. 2). Le besoin de nourriture des moustiques-hôtes assure aux sporozoïtes salivaires l'entrée dans le corps humain.

ABSENCE D'INFECTION OU INFECTION LATENTE AUTOMNALE.

On pourrait croire que les sporozoïtes ne sont plus viables, à cause du séjour trop prolongé dans l'Anophèle. Car à peine un cas de paludisme se déclare parmi les habitants des maisons infestées. Mais nous avons pu constater que les Anophèles, infectés expérimentalement en automne, chez lesquels le cycle évolutif du parasite s'accomplit dans le délai accoutumé, sous des conditions optimales de température, ne réussissent pas non plus à donner le paludisme par piqûre, quoique l'infection salivaire soit beaucoup plus intense qu'on ne la rencontre d'ordinaire dans la nature.

L'hypothèse d'autres influences, indépendantes de la température, qui rendent stériles les sporozoïtes développés en automne, est réfutée par l'observation suivante. Les moustiques infectés expérimentalement, quoique incapables de donner la maladie par une ou deux piqûres à sporozoïtes, y réussissent très bien, quand on multiplie ce nombre d'une manière excessive (15 à 20), bien au delà de ce qu'on observe dans les conditions naturelles. James (1927), qui, déjà avant nous, a fait des observations analogues, ajoute le fait impor-

(1) Le nombre des moustiques infectés semble augmenter de nouveau en février. Cette augmentation s'explique en partie par la réapparition d'Anophèles infectés en automne, cachés pendant les froids de janvier et traduisant leur ancienne infection par des oocystes imprégnés de chitine, sous la forme de « spores noires ».

Mais on observe aussi des Anophèles porteurs d'oocystes plus jeunes et de sporozoïtes salivaires. En laissant indécise la question de savoir si ces infections sont d'origine automnale ou plus récente, leur existence fait entrevoir la possibilité que les cas printaniers de paludisme ne sont pas tous contractés en automne, mais quelques-uns d'entre eux en janvier-mars. Nous nous bornons à toucher ce point sans y insister, car l'admission de cette possibilité ne change rien à notre thèse principale : que le paludisme se transmet pendant la période de dissociation gono-trophique, qui va de septembre à mars (fig. 4 A).

tant que les piqûres des Anophèles infectés en automne ne sont stériles qu'en apparence, parce que les sujets piqués finissent par tomber malades après une incubation de six à neuf mois (1).

Il existe donc une influence qui s'oppose à ce que l'infection se manifeste chez un sujet piqué par des Anophèles vecteurs du virus paludique en automne. Nous ne nous prononcerons pas sur la question de savoir si cette influence agit en diminuant

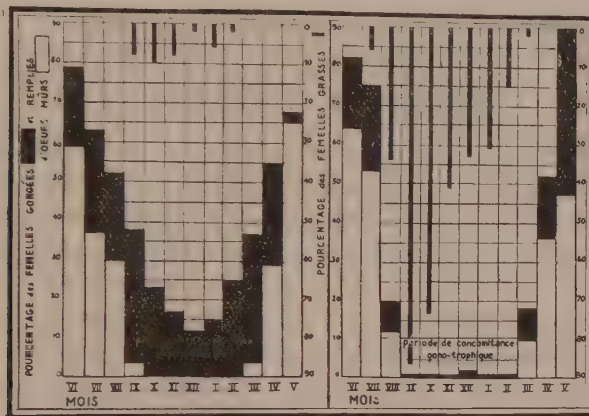


FIG. 4. — Variation mensuelle du nombre relatif des Anophèles femelles gorgées grasses et porteuses d'œufs mûrs, parmi des populations à dissociation ou concordance gono-trophique.

Colonnes noires : Pourcentage mensuel des femelles gorgées.

Colonnes blanches : Pourcentage mensuel des femelles porteuses d'œufs mûrs.

Colonnes noires étroites (qui doivent se lire de haut en bas) : Pourcentage mensuel des femelles à corps adipeux hypertrophié.

A. : Parmi les *populations à dissociation gono-trophique*. Nombre moyen examiné par mois : 3.393 exemplaires (2.574 pour l'hypertrophie adipeuse). Indice alaïre : 5 mm. 07 d'après la mesure de 17.328 exemplaires. Indice maxillaire 18,0 dents, d'après l'examen de 11.612 exemplaires.

B. : Parmi les *populations à concordance gono-trophique*. Nombre moyen examiné par mois : 2.436 exemplaires (1.467 pour l'hypertrophie adipeuse). Indice alaïre : 5 mm 45 d'après la mesure de 11.270 exemplaires. Indice maxillaire 17,0 dents, d'après l'examen de 8.665 exemplaires.

la virulence des sporozoïtes dans les moustiques ou en relevant l'immunité de l'homme.

(1) Nous avons répété ces expériences : 6 sujets ont été piqués par 1 ou 2 anophèles infectés, entre le 30 octobre et le 7 novembre 1928. Tous sont tombés malades de paludisme entre le 26 juin et le 2 août 1929, sept mois et vingt-sept jours à huit mois et trente jours plus tard.

Ces faits expliquent les observations de Korteweg (1902, 1921) de cas de paludisme de première invasion se déclarant dans les mois de février à mai, avant l'éclosion de la première génération anophélienne d'été. Ils confirment son hypothèse qu'il s'agit d'infections automnales qui restent latentes jusqu'au printemps. Ils nous font comprendre pourquoi l'épidémie palustre annuelle touche à son apogée [mai, juin (1)] longtemps avant que le nombre des Anophèles commence à augmenter sensiblement (fig. 1 A).

DISSOCIATION GONO-TROPHIQUE.

Des observations résumées ici, retenons ces trois conclusions :

1° Le parasite du paludisme peut finir son cycle amphigonique chez les Anophèles qui ne quittent plus les maisons en automne, moustiques « fixés » à cause de la cessation de l'ovulation;

2° Il peut pénétrer dans le corps humain parce que ces Anophèles continuent à piquer pendant l'automne;

3° Il ne cause la maladie chez un sujet piqué qu'après un délai de plusieurs mois, déterminant ainsi la poussée printanière qui constitue, chez nous, l'épidémie paludique.

Et ce fait principal :

Malgré l'arrêt de la production des œufs (de l'activité reproductrice), les Anophèles continuent à se nourrir de sang (activité nutritive). Nous l'appelons : « DISSOCIATION GONO-TROPHIQUE » (fig. 4 A).

CONCORDANCE GONO-TROPHIQUE.

Ce mécanisme, qui assure la transmission automnale, malgré l'attraction des Anophèles par les étables habitées, grâce à la rupture des rapports de ces moustiques avec les étables, nous explique la présence du paludisme dans un pays où la transmission est difficile pendant l'été.

Mais maintenant le problème contraire se pose. Nous ne nous étonnons plus que le paludisme existe, mais qu'il manque dans plusieurs régions littorales des Pays-Bas. Même si l'attrac-

(1) En ajoutant les rechutes, le maximum se présente en juillet.

tion des Anophèles par les étables habitées y était plus grande que dans les régions impaludées, son effet se trouverait neutralisé par la dissociation gono-trophique.

Toutes les conditions énumérées ici s'y retrouvent : la cessation de l'ovulation, la « sédentarité », l'augmentation automnale. Le nombre absolu des Anophèles dans les maisons des régions indemnes, pendant les mois de septembre à décembre (c'est-à-dire pendant la saison du paludisme des Anophèles) est même quatre à six fois plus grand que dans celles des régions impaludées. Le contraire s'observe (pendant la même période) dans les étables des premières régions, où ce nombre ne s'élève qu'à 7 p. 100 de celui qu'on observe dans les étables des dernières.

Il n'y a qu'une seule différence : l'activité nutritive (1). La majorité des Anophèles n'éprouvent plus le besoin de se nourrir de sang, du moment (commencement de septembre) qu'ils renoncent à l'activité reproductrice. Nous appelons cette condition : CONCORDANCE GONO-TROPHIQUE (fig. 4 B).

Ces Anophèles ne participent donc pas à la transmission du paludisme : quoiqu'ils se trouvent « fixés » dans les maisons, ils ne piquent plus. Il ne leur reste que la transmission estivale et nous avons déjà indiqué les difficultés qui s'opposent à son accomplissement. Cette difficulté n'est pas moindre dans les habitats des Anophèles à concordance gonotrophique, quoique leur nombre dans les maisons en été, par rapport à celui des étables, soit à peu près le triple de celui qu'on observe dans les lieux où prédominent les Anophèles à disso-

(1) Ajoutons qu'il y a une autre différence, dont nous ne connaissons pas encore la signification : l'*hypertrophie du corps adipeux*. Elle ne se montre que dans 2-10 p. 100 des Anophèles à dissociation gono-trophique, de septembre à février (fig. 4 A). Parmi les moustiques à concordance gono-trophique elle fait déjà son début en juillet; en septembre et octobre 70-90 p. 100 en sont atteints (fig. 4 B). L'explication trop facile, que la substance adipeuse est un aliment de réserve, permettant un jeûne prolongé, est réfutée par l'épuisement du corps adipeux en novembre. Quatre mois de jeûne complet sont subis alors par des Anophèles dont les deux tiers sont maigres. Le fait que les Anophèles impaludés en automne se trouvent parmi un groupe de moustiques rarement atteint d'hypertrophie du corps adipeux s'oppose à l'hypothèse qui réserve aux Anophèles gras la fonction de conserver pendant l'hiver l'infection paludéenne. Enfin, la disparition de la fonction reproductrice sans hypertrophie adipeuse, pendant la dissociation gono-trophique, s'oppose à notre supposition (1922) d'un antagonisme du système adipeux et ovarien (voir aussi : Roubaud, 1923).

ciation gono-trophique (1). Mais le pourcentage des femelles gorgées, dans les maisons où se trouvent les premiers de juin à août, n'est que la moitié (29 p. 100) de ce qu'on observe dans les maisons où se tiennent les seconds (59 p. 100). De ces femelles gorgées 64 p. 100 seulement ont sucé le sang humain, au lieu des 87 p. 100 qu'on trouve parmi les femelles de la seconde catégorie. D'autre part, le pourcentage des femelles gorgées dans les étables, s'élève à 85 p. 100 (mai-juillet) dans les habitats des Anophèles de la première catégorie, et à 77 p. 100 dans ceux de la seconde. Ajoutons que les Anophèles à concordance gono-trophique, maintenus en captivité, sont moins prêts à se nourrir de sang humain et exposés à une plus grande mortalité en été que les représentants de l'autre type (de Buck, Schoute en Swellengrebel 1928). Il semble donc que dans les lieux habités par les premiers la transmission du paludisme en été soit bloquée d'une manière aussi (peut-être même encore plus) efficace que dans les régions où les seconds prédominent. Par conséquent les Anophèles à concordance gono-trophique, ne jouent qu'un rôle sans importance dans la transmission du paludisme aux Pays-Bas.

DISTRIBUTION GÉOGRAPHIQUE DES DEUX TYPES.

La connaissance de l'existence des deux types biologiques d'Anophèles nous serait inutile s'ils se trouvaient mélangés partout d'une manière uniforme. Mais ce n'est pas le cas et parmi leurs habitats nous pouvons distinguer globalement trois classes, comportant une population biologique d'Anophèles à caractères distincts.

1° Celle où ne se montre que la dissociation gono-trophique. Parmi ces régions on trouve les centres endémiques. Pour le reste, l'absence ou la présence du paludisme paraît dépendre de la densité de la faune anophélienne.]

2° Celle qui ne montre que la concordance gono-trophique. Ce sont les régions indemnes de paludisme, même si la densité des Anophèles y est élevée.]

3° Celle qui est de composition mixte, caractérisée au

(1) A cause de leur nombre moins élevé dans les étables; les chiffres exacts sont 4 par maison et 286 par étable.

commencement de l'automne (quand les moustiques « se fixent » dans les localités diverses) par les Anophèles à concordance gonotrophique s'établissant dans les greniers des étables, maisons, granges, etc., et les autres dans les localités habitées.

Ce phénomène, que nous avons décrit (1928) sous le nom de SÉGRÉGATION AUTOMNALE, nous permet d'apprécier le nombre de chacun des deux composants de la population mixte des Anophèles. La place qu'occupe une telle région à faune mixte : soit parmi les régions endémiques indemnes, ou à paludisme sporadique, est déterminée par la densité du composant à dissocation gono-trophique.

CONCORDANCE ENTRE LA BIOLOGIE ET LA MORPHOLOGIE DES ANOPHÈLES.

La morphologie nous aide à nous orienter aisément sur la composition de la faune anophélienne d'une région donnée (1). La population à dissocation gono-trophique possède des ailes d'une longueur moyenne (indice alaire) inférieure et d'un nombre moyen de dents maxillaires (indice maxillaire) supérieur à celui des Anophèles à concordance gono-trophique (fig. 4). Dans les régions où les Anophèles se séparent par la ségrégation automnale, on trouve dans les greniers, maisons, etc., des moustiques à indice alaire plus grand et à indice maxillaire plus petit que ceux qui se « fixent » dans les étables. Dans les régions où la population anophélienne est pure, au point de vue biologique, on ne trouve que l'un ou l'autre de ces types morphologiques.

La corrélation entre les caractères morphologiques et biologiques, quoiqu'elle facilite la recherche, n'est pas d'une signification essentielle. Les Anophèles à dissocation gono-trophique se présentent, par ce caractère même, comme les principaux vecteurs du paludisme aux Pays-Bas, qu'ils soient reconnaissables par leur morphologie ou non (2).

(1) Voir VAN THIEL (1927, 1928); SWELLENGREBEL, DE BUCK et SCHOUTE (1927, 1928).

(2) Nous avons envisagé ailleurs (1928) la question de savoir s'il s'agit de races héréditaires ou de modifications causées par le milieu ambiant. Pour le moment, nous pouvons la laisser de côté en retenant, toutefois, que la distribution géographique de ces races ou modifications reste sensiblement constante, depuis le commencement de nos observations en 1925.

INTERVENTION DES ÉTABLES HABITÉES.

De ce qui précède, il ne faut pas conclure que nous n'accordons aucune importance à l'attraction que les étables habitées exercent sur les Anophèles dans les Pays-Bas. Nous la considérons, au contraire, comme la base de la situation épidémiologique. Sans elle, la transmission du paludisme ne se trouverait pas entravée pendant la période d'activité reproductrice. Mais ce facteur préventif, même poussé au plus haut degré d'efficacité, est impuissant à empêcher la transmission automnale, qui n'est supprimée que par l'effet de la concordance gono-trophique.

III. — La situation dans le passé.

L'ensemble des faits mentionnés ici nous explique les conditions épidémiologiques actuelles, qui, sans ces considérations apparaissent paradoxales. Rend-t-il compte également de celles qui régnaient autrefois?

COURS DE L'ÉPIDÉMIE ANNUELLE DANS LE PASSÉ.

On connaît la part importante réservée au paludisme dans l'histoire de la nosologie des Pays-Bas (voir par exemple : Laveran 1907). Ce n'est pas ici le lieu de répéter les arguments prouvant que cette opinion est fondée en partie sur des interprétations inexactes des données historiques et statistiques (Honig et Swellengrebel 1925-1928). Les corrections qui s'imposent laissent encore nombre de faits qu'on ne saurait expliquer qu'en admettant que le paludisme était non seulement plus fréquent qu'aujourd'hui (même au cours du XIX^e siècle), mais encore que la répartition saisonnière était différente. A côté de la poussée de tierce au printemps, bien connue de nos jours, il y en avait une autre, plus marquée, d'août à novembre (avec un maximum en septembre ou octobre). Enfin la fièvre quarte, presque disparue aujourd'hui, n'avait qu'une seule période épidémique d'octobre à janvier, sans poussée printanière.

FIÈVRE QUARTE.

La coïncidence du cours épidémique de la fièvre quartе avec celui des infections d'Anophèles d'aujourd'hui est si nette qu'elle nous porte à croire que ce cours reproduit fidèlement celui que devrait suivre l'épidémie tierce de nos jours, si elle n'était pas arrêtée par l'infection latente automnale (fig. 1 C et 2 C).

Il est raisonnable d'inférer que les vecteurs de la fièvre quartе ne se trouvaient que parmi les Anophèles « fixés », à dissociation gono-trophique et que la maladie se déclarait après la piqure, sans se laisser arrêter par l'infection latente automnale.

FIÈVRE TIERCE BÉNIGNE.

Les faits connus conduisent à la conclusion que, dans la genèse de la poussée estivo-automnale de tierce bénigne, deux facteurs entraient en jeu. L'un était l'infection anophélienne, opérant pendant l'activité sexuelle des moustiques, ce qui suggère que l'attraction des Anophèles par les étables habitées était alors beaucoup moins forte qu'à présent. L'autre était l'infection automnale des Anophèles fixés, telle qu'on la trouve encore de nos jours. Avec cette différence, toutefois, que l'effet de l'infection latente automnale n'était que fort incomplet : de nombreux cas de paludisme causés par les infections automnales se déclaraient sans délai et se combinaient à ceux d'origine estivale pour produire l'épidémie dont nous traçons la genèse. D'autres cas d'origine automnale restaient latents et se manifestaient au printemps comme c'est le cas aujourd'hui (fig. 1 B et 2 B).

DIFFÉRENCES DU PALUDISME D'AUJOURD'HUI ET DU PASSÉ.

La différence entre les conditions épidémiologiques actuelles et passées peut donc se résumer ainsi :

1° IMPUISSANCE DE L'INFECTION LATENTE AUTOMNALE à empêcher la manifestation, dans le délai ordinaire, des infections causées par les Anophèles « fixés », qui piquent l'homme et qui sont porteurs de parasites.

- a) Impuissance complète à empêcher la fièvre quarte.
- b) Impuissance incomplète à empêcher la fièvre tierce.

2° IMPUISSANCE DE L'ATTRACTION que les étables habitées exercent sur les Anophèles, à prévenir la transmission à l'homme de l'infection de tierce bénigne des moustiques, qui se trouvent en pleine activité reproductrice.

Et comme conséquence des précédents :

3° EXISTENCE SIMULTANÉE DE L'ÉPIDÉMIE PALUSTRE DE L'HOMME ET DE L'ANOPHÈLE, pendant la période de fixation automnale du dernier. Ceci devait assurer aux moustiques fixés une provision de porteurs de gamètes plus abondante que celle offerte à nos Anophèles contemporains. Car ceux-là ne disposent que des restes d'une épidémie humaine qui a depuis déjà longtemps passé son apogée. Il est probable que cette circonstance suffit à expliquer en grande partie l'intensité du paludisme dans le passé en dehors de l'hypothèse d'une population anophélienne plus nombreuse que celle qui existe aujourd'hui.

IV. — La dissociation gono-trophique dans ses rapports avec l'infection domiciliaire.

DISSOCIATION GONO-TROPHIQUE ET HIBERNATION.

En revenant maintenant à notre point de départ, l'infection domiciliaire, nous reconnaissons, dans l'ensemble des conditions que nous désignons par le nom de dissociation gono-trophique, les circonstances (mentionnées dans notre introduction), qui interviennent dans l'infection domiciliaire, en retenant les Anophèles à la maison sans entraver leur fonction de transmettre le paludisme. Mais il faut bien admettre que ce facteur n'agit que pendant l'hibernation. Nos conclusions ne seraient donc applicables qu'aux régions tempérées.

Toutefois, il est difficile de croire que la dissociation gono-trophique, qui constitue un ajustement si admirable du mécanisme de transmission du paludisme, ne serait qu'un phénomène d'ordre purement local. Faisons remarquer qu'il ne manque pas de régions tropicales où le paludisme, pour se maintenir, devra s'opposer aux effets de l'attraction des Ano-

phèles par les étables habitées (1). Dans cette lutte, il n'y aurait pas d'arme plus utile à la propagation du paludisme que la dissociation gono-trophique (2). Elle lui serait même plus utile dans les pays chauds que dans ceux à climat tempéré, parce que la chaleur agirait en incitant les moustiques à piquer et en accélérant le développement amphigonique du parasite.

L'HIBERNATION N'EST PAS UNE CONDITION INDISPENSABLE.

Doit-on conclure que la nature se passe de cette arme, seulement à défaut d'une saison froide? Cette conclusion nous paraît peu raisonnable, attendu que la dissociation gono-trophique n'est pas nécessairement liée à l'hibernation. Seule la concordance gono-trophique, qui ne peut exister que pendant le ralentissement de toutes les fonctions vitales est la marque de l'hibernation vraie. La dissociation gono-trophique, au contraire, qui présuppose la continuation de ces fonctions, à l'exception de l'activité reproductrice, n'est possible que quand l'hibernation reste incomplète et revêt le caractère de la « semi-hibernation » de Grassi (1923). D'autre part, rien ne s'oppose à ce qu'elle soit provoquée par l'intervention de toute autre période de repos sexuel, pourvu qu'elle soit subie par l'insecte au stade adulte. Dans les pays chauds une telle période n'aurait pour conséquences que la dissociation gono-trophique, car la concordance gono-trophique y serait évidemment impossible.

Il faudrait accepter cette conclusion, même si elle ne nous paraissait pas raisonnable, si elle s'imposait par les faits. Mais ce n'est pas le cas. Nous connaissons une « estivation » chez quelques espèces d'*Anophèles* tropicaux. Ce phénomène pourrait fort bien servir à mettre notre hypothèse à l'épreuve.

(1) Voir par exemple : SCHUFFNER, SWELLENGREBEL, SWELLENGREBEL-DE GRAAF et ACHMAD MOCHTAR (1919).

(2) Cette remarque n'implique pas que l'existence même du paludisme dépende de la dissociation gono-trophique (excepté dans les régions où la transmission pendant l'activité reproductrice des *Anophèles* est impossible). En général, on verra se succéder la transmission à infection domiciliaire (pourvu que la dissociation gono-trophique existe) et la transmission à infection non localisée (pourvu que l'attraction stabulaire ne suffise pas à l'empêcher). L'importance relative de la première est en rapport direct, celle de la seconde en rapport inverse avec le degré de l'attraction stabulaire.

Mais la littérature ne nous éclaire pas au sujet de l'existence ou de l'absence de la dissociation gono-trophique dans l'estivation (1). Il manque des observations, poursuivies pendant un certain nombre d'années, sur les variations mensuelles du nombre des femelles gorgées, en état de maturité sexuelle et grasses, des mâles, des larves, de la densité de l'infection anophélienne par rapport à l'infection humaine, qui seules nous ont permis d'élaborer la présente analyse.

L'INFECTION DOMICILIAIRE DÉPEND DE LA DISSOCIATION GONO-TROPHIQUE.

Il serait pourtant utile d'être renseigné sur ce sujet, qui devra orienter dans une large mesure notre opinion sur la théorie de l'infection domiciliaire. Car les faits connus jusqu'à présent rendent cette théorie inadmissible, à moins que son application ne se limite qu'aux populations d'Anophèles qui subissent une période de dissociation gono-trophique, ce qui lève l'objection principale : l'instabilité des Anophèles.

La valeur de la théorie de l'infection domiciliaire appliquée à la lutte contre le paludisme dépend donc de la signification de la dissociation gono-trophique comme principe général dans le mécanisme de la transmission de cette maladie.

V. — Sommaire.

L'attraction des Anophèles par les étables habitées dans les Pays-Bas rendrait l'existence du paludisme précaire, sans une série de circonstances, qui permettent l'infection domiciliaire et se présentent à la suite de la suspension de l'activité reproductrice des Anophèles en septembre.

Celle-ci a pour premier effet le séjour permanent (FIXATION [2])

(1) Les ovaires des Anophèles estivants sont bien développés. Il n'existe donc pas de dissociation gono-trophique proprement dite. Mais l'effet essentiel de ce phénomène n'y fait pas défaut : *continuation des fonctions nutritives parmi les Anophèles qui ne pondent plus*, même s'il se trouve de l'eau propre à la ponte tout près des maisons où ils sont abondants. (Stephens et Christophers, 1908).

(2) ROUBAUD (1925, 1928A) a énoncé des notions sensiblement analogues que l'on trouvera aussi dans notre publication de 1922B.

des Anophèles dans les maisons avec ses conséquences : augmentation de leur nombre et rétention des Anophèles infectés (s'il y en a). Mais cela ne suffirait pas à causer le paludisme.

On s'en aperçoit dans les régions où il y a une corrélation parfaite entre les fonctions sexuelles et nutritives, le développement de l'une entraînant celle de l'autre (CONCORDANCE GONOTROPHIQUE) : le paludisme y fait défaut.

Il n'existe que là où cette corrélation manque, c'est-à-dire où les Anophèles continuent à se nourrir de sang après la fin de l'activité reproductrice (DISSOCIATION GONOTROPHIQUE).

Dans ces régions, la transmission du paludisme est assurée : 1° par l'amphigonie du plasmodium s'accomplissant aussi en automne ; 2° par la « fixation » qui permet à ce développement de se poursuivre et de se compléter dans les maisons, sans entrave causée par l'intervention des étables ; 3° par la dissociation gono-trophique qui permet le transport des parasites de l'homme à l'Anophèle et vice versa.

L'INFECTION LATENTE AUTOMNALE n'intervient que comme complication externe dans cette succession de causes et d'effets, en retardant jusqu'au printemps l'éclosion du paludisme humain, qui est pourtant la conséquence du paludisme automnal des Anophèles. Elle cause ainsi le phénomène paradoxal d'une poussée épidémique à une saison de densité minimale des Anophèles.

Dans le passé cette complication n'intervenait que plus faiblement, ou pas du tout. Le cours que prit alors le paludisme était beaucoup plus rationnel que de nos jours. La fièvre quarte en est un exemple ; son cours, limité à l'automne, s'explique parfaitement par une épidémie anophélienne, analogue à celle que nous observons actuellement.

Cette circonstance permettait au paludisme automnal : 1° de se déclarer sans délai ; 2° de se combiner au paludisme estival (conséquence de l'attraction stabulaire insuffisante) ; 3° de constituer ainsi un cercle vicieux qui favorisait une transmission automnale beaucoup plus active que celle de nos jours.

Le rapport intime entre la dissociation gono-trophique et l'hibernation n'existe qu'en apparence. Au contraire, l'hibernation complète rend la dissociation impossible.

L'importance pratique de « l'infection domiciliaire » dépend dans une large mesure de l'existence de la dissociation gonotro-

phique, parce que celle-ci supprime l'obstacle de l'instabilité des Anophèles visitant les maisons, qui s'oppose à la réalisation de l'infection.

La question qui se pose à la suite de nos recherches est donc de savoir : *a*) si la dissociation gono-trophique (ou une condition essentiellement analogue) existe en dehors des zones tempérées; *b*) quelle est son rapport avec la distribution saisonnière du paludisme.

BIBLIOGRAPHIE

- BARBER et HAYNE (1924). Some observations on the dispersal of adult Anopheles. *U. S. Publ. Hlth Repts.*, Washington D. C., **39**, n° 5, pp. 195-203.
- DE BUCK, SCHOUTE et SWELLENGREBEL (1928). Studien ueber Anophelismus ohne Malaria in der Umgebung Amsterdams. *Centralbl. f. Bakter.*, Abt. I, Orig., Jena, **109**, n° 5-6, pp. 251-284.
- DAVIS (1926). Study on the dispersion of resting Anopheline mosquitoes from dwellings in Brazil. *Americ. Journ. of Hygiene*, Baltimore Md., **6**, Suppl. de mars, pp. 23-35.
- GRASSI (1920). Osservazioni sulla vita degli Anofeli. *Rend. R. Accad. Naz. Lincei*. Class. d. Sci. fis. mat. e nat., Roma, Ser. 5a, **29**, pp. 339-344.
- GRASSI (1923). Nuovi contributi all biologia degli Anofeli. *Ibid*, **32**, pp. 373-375 et 438-442.
- HONIG (1922). Studie over de malaria te Nieuwendam en omgeving. (Etude sur le Paludisme à N. et ses environs). *Thèse, Amsterdam*. J. H. de Bussy éditeur, pp. 26-32.
- HONIG et SWELLENGREBEL (1925-1928). Bydrage tot de geschiedenis der malaria in Nederland. (Contribution à l'histoire du Paludisme dans les Pays-Bas). *Nederl. Tydschr. v. Geneesk.*, Haarlem (Pays-Bas, **69**, 1^{re} partie, n° 23, pp. 2538-2555; 2^e partie, n° 2, pp. 247-257; **79**, 2^e partie, n° 10, pp. 1104-1120; n° 17, pp. 1864-1875; **72**, 1^{re} partie, n° 1, pp. 38-47.
- JAMES (1926). Report on the first results of laboratory work on malaria in England. *Public League of Nations*, **3**, Health, n° 6, Genève, pp. 1-30.
- JAMES (1927). Communication faite dans la séance d'octobre de la Commission du Paludisme de la section d'hygiène de la Société des Nations.
- KLIGLER et LIEBMAN (1928). Studies on malaria in an uncontrolled hyperendemic area. II. Changes in the resting places of Anopheles with special reference to infected mosquitoes. *Journ. of Prevent. Medic.*, Baltimore Md., **2**, n° 5, pp. 433-440.
- KORTEWEG (1902). Klinische observaties over malaria in den winter van 1901-1902. (Observations cliniques sur le Paludisme pendant l'hiver de 1901-1902). Herinneringsbundel van Prof. Rosenstein. Leyde (Pays-Bas), E. Ydo éditeur, pp. 263-281.
- KORTEWEG (1920). De epidemiologische en klinische ervaringen over malaria in de Zaanstreek. (Expériences épidémiologiques et cliniques sur le Paludisme dans la région du fleuve Zaan). *Geneesk. Bladen*, Haarlem (Pays-Bas), **22**, n° 1, pp. 1-40.

- KORTEWEG et SWELLENGREBEL (1921). Wanneer heeft ten onzent de malaria besmetting plaats. (En quelle saison prend-on le paludisme chez nous). *Nederl. Tydschr. v. Geneesk.*, Haarlem (Pays-Bas), **65**, 2^e partie, n° 12, pp. 1485-1488.
- LAVERAN (1907). *Traité du Paludisme*. 2^e édition, Paris, Masson et C^{ie} éditeurs, pp. 36-37.
- MISSIROLI et HACKETT (1927). La regressione spontanea della malaria in alcune regioni d'Italia. *Riv. di Malariologia*, Roma, **6**, n° 2, pp. 193-243.
- ROUBAUD (1920). Les conditions de nutrition des Anophèles en France. *Ces Annales*, Paris, **34**, n° 4, pp. 181-228.
- ROUBAUD (1923). Les désharmonies de la fonction rénale et leurs conséquences biologiques chez les moustiques. *Ces Annales*, Paris, **37**, n° 7, pp. 627-679.
- ROUBAUD (1923). Les raisons de l'absence en Europe septentrionale de l'endémie palustre estivo-automnale. *Bull. Soc. Path. Exot.*, **18**, n° 3, pp. 279-287.
- ROUBAUD (1928A). Sur l'inaptitude du Plasmodium praecox à l'évolution hivernale chez l'Anopheles maculipennis et ses conséquences épidémiologiques pour l'Europe septentrionale. *C. R. Ac. des Sciences*, Paris, **186**, n° 5, pp. 329-331.
- ROUBAUD (1928B). Nouvelles recherches sur l'évolution zoophile des faunes d'Anophèles en Europe d'après les données de l'armement maxillaire. *Ces Annales*, Paris, **42**, n° 5, pp. 553-616.
- SCHÜFFNER, SWELLENGREBEL, SWELLENGREBEL DE GRAAF et MOCHTAR (1919). On the biology of M. ludlowi in Sumatra. *Mededeel. v. d. Burgerel Geneesk. Dienst in Nederl. Indië*, Batavia (Java), 8^e année, n° 3 pp. 65-90.
- STEPHENS et CHRISTOPHERS (1908). *The practical study of malaria*, 3^e édition, Londres, Williams et Norgate éditeurs, p. 104.
- SWELLENGREBEL (1922A). Fréquence saisonnière des Anophèles impaludés aux environs d'Amsterdam. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, Paris, **15**, n° 2, pp. 116-119.
- SWELLENGREBEL (1922B). Het overwinteren van Anopheles maculipennis in de omgeving van Amsterdam. (L'hibernation d'A. m. dans les environs d'Amsterdam). *Tydschr. v. vergelykende Geneesk.*, Leyde (Pays-Bas), **7**, n° 4, pp. 297-303.
- SWELLENGREBEL (1924). Nadere byzonderheden over de herfst-enwinterbesmettingen met malariaparasieten van A. maculipennis om Amsterdam. (Détails sur l'infection paludique automnale et hivernale d'A. maculip. aux environs d'A.). *Nederl. Tydschr. Geneesk.*, Haarlem (Pays-Bas), **68**, 2^e partie, n° 6, pp. 750-763.
- SWELLENGREBEL, DE BUCK et SCHOUTE (1927-1928). On Anophelism without malaria around Amsterdam. *Proceed. Roy. Acad. of Science*, 2^e section, Amsterdam (Pays-Bas), **30**, n° 1, pp. 61-68; **31**, n° 4-5, pp. 531-539.
- VAN THIEL (1927). Sur l'origine des variations de taille de l'A. maculipennis dans les Pays-Bas. *Bull. Soc. Pathol. Exot.*, Paris, **20**, n° 4, pp. 366-390.
- VAN THIEL (1928). La nourriture des larves d'A. maculipennis en rapport avec le problème de l'existence de la variété atroparvus. *Ibid.*, **31**, n° 7, 8 et 9, pp. 551-574, 687-693 et 797-807.

Le Gérant : G. MASSON.



